

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193214** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.14

(22) Дата подачи заявки
2020.05.22

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ГЕНЫ UBE3A И КАССЕТЫ ЭКСПРЕССИИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(31) **62/851,411**

(32) **2019.05.22**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/034171**

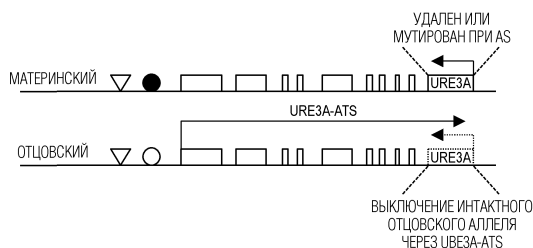
(87) **WO 2020/237130 2020.11.26**

(71) Заявитель:
**ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОРТ
КАРОЛИНА ЭТ ЧЕПЕЛ ХИЛЛ (US)**

(72) Изобретатель:
**Филпот Бенджамин Дэвид, Грей
Стивен Джеймс, Шинг Чарльз,
Джадсон Мэттью (US)**

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

(57) Изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим последовательности открытой рамки считывания (ORF) UBE3A, векторам, содержащим их, и способам их использования для доставки ORF в клетку или субъекту и для лечения нарушений, связанных с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта, таких как синдром Эйнджелмена.



A1

202193214

202193214

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571811EA/061

ГЕНЫ UBE3A И КАССЕТЫ ЭКСПРЕССИИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПРИОРИТЕТЕ

По этой заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC § 119(e) предварительной заявки США № 62/851,411, поданной 22 мая 2019 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДАЧЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей в текстовом формате ASCII, представленный в соответствии с 37 C.F.R. § 1.821, озаглавленный 5470-867WO_ST25.txt, размером 49256 байт, сгенерированный 22 мая 2020 года и поданный через EFS-Web, предоставляется вместо бумажной копии. Этот список последовательностей настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки в спецификацию для его описания.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим последовательности открытой рамки считывания (ORF) UBE3A, векторам, содержащим их, и способам их использования для доставки ORF в клетку или субъекту и для лечения нарушений, ассоциированных с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта, таких как синдром Эйнджелмена.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Синдром Эйнджелмена (AS) представляет собой нарушение психического развития, которым страдают примерно 1:15000 человек. У людей с AS есть судороги, двигательные расстройства, умственная отсталость и отсутствие речи на протяжении всей жизни. У людей обычно наблюдается атаксия в течение первого года жизни. Утрата функционального гена UBE3A в нейронах вызывает AS.

UBE3A расположен на хромосоме 15 и является единственным геном в области 15q11-q13, который демонстрирует смещенную экспрессию от материнского аллеля. Отцовский аллель подавляется в нейронах из-за отцовского импринтинга. Соответственно, и делеции материнского 15q11-13, и мутации с потерей функции материнского UBE3A вызывают AS (см. **Фиг. 1**). Точечных мутаций, которые нарушают функцию убиквитинлигазы E3 белка UBE3A (также известной как убиквитин-протеинлигаза E6AP (E6AP)), достаточно для получения полного спектра фенотипов AS, что подчеркивает важность UBE3A для патогенеза AS. Все согласны с тем, что потеря нейронами UBE3A вызывает AS. Глии с меньшей вероятностью играют роль, поскольку в отличие от нейронов они экспрессируют UBE3A двуаллельно и на очень низких уровнях.

В настоящее время не существует специальных способов лечения AS. Пациентам, страдающим AS, предоставляется поддерживающая симптоматическая помощь.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение частично основано на разработке оптимизированных генов

UBE3A, кассет экспрессии и векторов, способных обеспечивать терапевтические уровни экспрессии UBE3A для лечения нарушений, связанных с неправильной экспрессией UBE3A, таких как синдром Эйнджелмена. Аспекты настоящего изобретения преодолевают недостатки в данной области техники, предоставляя кодон-оптимизированные гены UBE3A, кассеты экспрессии и векторы, способные обеспечивать терапевтические уровни экспрессии UBE3A для лечения нарушений, связанных с экспрессией UBE3A, таких как AS.

Таким образом, один аспект изобретения относится к полинуклеотиду, содержащему открытую рамку считывания UBE3A человека, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую и длинную изоформу UBE3A человека.

Другой аспект изобретения относится к кассете экспрессии, содержащей полинуклеотид, содержащий открытую рамку считывания UBE3A человека, и векторы, трансформированные клетки и трансгенных животных, содержащих полинуклеотид по изобретению.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтическому составу, содержащему полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе.

Дополнительный аспект изобретения относится к способу экспрессии открытой рамки считывания UBE3A в клетке, включающему контакт клетки с полинуклеотидом, кассетой экспрессии и/или вектором по изобретению, тем самым вызывая экспрессию открытую рамку считывания UBE3A в клетке.

Другой аспект изобретения относится к способу экспрессии открытой рамки считывания UBE3A у субъекта, включающему доставку субъекту полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по изобретению, тем самым вызывая экспрессию открытую рамку считывания UBE3A в субъекте.

Дополнительный аспект изобретения относится к способу лечения нарушения, ассоциированного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по изобретению, так, чтобы открытая рамка считывания UBE3A экспрессировалась в субъекте.

Другой аспект изобретения относится к способу лечения синдрома Эйнджелмена (AS) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по изобретению, так, чтобы открытая рамка считывания UBE3A экспрессировалась в субъекте.

Другой аспект изобретения относится к полинуклеотиду, кассете экспрессии, вектору и/или трансформированной клетке по изобретению для использования в способе лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A, у субъекта, нуждающегося в этом.

Эти и другие аспекты изобретения изложены более подробно в описании изобретения ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **ФИГ. 1** показана схема нейрональной регуляции UBE3A, где нейроны имеют отцовский сайленсинг UBE3A.

На **ФИГ. 2А-2В** показан экспериментальный план для флуротилового киндлинга и провокационной пробы (**ФИГ. 2А**) и пороги генерализованных приступов (GST, **ФИГ. 2В**) для мышей дикого типа (WT), мышей, лишенных длинного UBE3A (ISO2-KO), и мышей, лишенных короткого UBE3A (ISO3-KO).

На **ФИГ. 3А** показаны N-концевые аминокислотные последовательности изоформ UBE3A WT человека и мыши (SEQ ID NO: 15-19). Изоформа 1 мыши (не показана) усечена и не экспрессирует стабильный белок.

На **ФИГ. 3В** показана 5'-последовательность ДНК кодон-оптимизированной открытой рамки считывания hUBE3A1>>3 (SEQ ID NO: 20) (вверху) при регистрации соответствующих аминокислотных остатков полученного белка hUBE3A (SEQ ID NO: 21) (внизу). И длинный, и короткий hUBE3A кодированы в одной и той же рамке считывания. Последовательности Козака разной силы конструируют для смещения инициации трансляции со второго стартового кодона (**CAGGATGA**), начинающего короткую изоформу hUBE3A.

На **ФИГ. 3С** схематически показана полная конструкция для генной терапии AS для экспрессии как длинной (изоформа 3), так и короткой (изоформа 1) изоформ hUBE3A (SEQ ID NO: 22-24).

На **ФИГ. 4** показаны окрашенные UBE3A сагиттальные срезы, полученные в модели мышей WT и AS (Ube3a^{m-/+}), мыши AS демонстрируют почти полную потерю нейрональной экспрессии UBE3A (Jiang et al, Neuron, 1998;21(4):799-811).

На **ФИГ. 5** приведены результаты экспериментов капельной цифровой ПЦР для определения либо эндогенных UBE3A транскриптов мыши (mUbe3a, левая панель), либо кодон-оптимизированных UBE3A транскриптов человека (hUBE3A-opt, правая панель), обратно транскрибированных из мРНК гиппокампа мыши. Гиппокампы собирают у взрослых мышей WT и AS после ICV инъекции носителя или вируса генной терапии AS (PHR.B/hUBE3A) в точке P1. Обратите внимание на селективное определение hUBE3A-opt в леченной генной терапией группе AS+AAV.

На **ФИГ. 6** показан вестерн-блоттинг лизатов цельного мозга мыши P9 с использованием антитела UBE3A, которое одинаково связывает UBE3A и мыши, и человека, независимо от изоформы. В образце WT (крайний слева) основная полоса, представляющая короткую изоформу UBE3A, соседствует с второстепенной полосой, расположенной непосредственно в верхнем поле, которая соответствует длинному UBE3A (отношение длинных к коротким, ~5:1). В образце от материнских мышей ISO3-KO (крайний справа), у которых отсутствует нейрональная экспрессия короткого UBE3A, отношение длинного:короткого UBE3A резко снижено, что обеспечивает очень четкое

разрешение двух дискретных полос изоформы UBE3A. Образцы от гомозиготных мышей ISO3-KO (вторая слева) дают только полосу длинной изоформы. Образцы мышей AS, обработанных PHP.B/hUBE3A (второй справа), экспрессируют как короткие, так и длинные изоформы hUBE3A в соотношении приблизительно 3:1, что демонстрирует возможность применения двойного изоформного подхода.

На **ФИГ. 7А-7В** показаны результаты иммуногистохимии мышей моделей WT и AS. На **ФИГ. 7А** показаны латерально-медиальные серии окрашенных UBE3A сагиттальных срезов, собранных у мышей различного возраста после рождения (P10, P15, P25) после ICV инъекции вируса генной терапии AS (PHP.B/hUBE3A) в P1. На **ФИГ. 7В** показана эффективность переноса гена hUBE3A в области СА3 гиппокампа на конфокальных микрофотографиях с большим увеличением. Стрелки указывают на редкие нейроны (NeuN+), не ре-экспрессирующие UBE3A. Белок UBE3A демонстрирует выраженную ядерную локализацию, соответствующую доминантной экспрессии короткой изоформы hUBE3A.

На **ФИГ. 8** показан сдвиг из цитоплазмы в ядро в субклеточной локализации после переноса гена hUBE3A. **Панели А-С** показывают окрашенный UBE3A слой 2/3 неокортекса из мышей модели AS на P10 (**панель А**), P15 (**панель В**) и P20 (**панель С**) после ICV инъекции вируса PHP.B/hUBE3A на P1. Постепенное накопление вирусно трансдуцированного hUBE3A в ядре наблюдается по мере развития, точно воспроизводя пространственно-временные профили эндогенной экспрессии UBE3A, как показано на **Панелях D-F** из Judson et al., J Comparative Neurology, 2014:522(8):1874-1896.

На **ФИГ. 9** показан ежемесячный общий прирост массы самцов мышей WT и AS, которым вводили ICV инъекцию в дни после рождения 0-2 либо носителя, либо вируса генной терапии AS (PHP.B/hUBE3A). Масса тела была статистически аналогичной в экспериментальных группах в возрасте одного месяца - WT+носитель, WT+AAV, AS+носитель, AS+AAV - демонстрируя хорошую переносимость переноса гена hUBE3A и отсутствие явной токсичности. К двум месяцам, и сохраняясь во взрослом возрасте, мыши с AS+носитель демонстрируют статистически значимое увеличение массы тела. Этот фенотип был полностью сохранен у мышей AS+AAV.

На **ФИГ. 10** показаны результаты поведенческого тестирования в модели взрослых мышей WT и AS с ICV инъекцией носителя (WT+носитель, AS+носитель) или вируса генной терапии AS PHP.B/hUBE3A (WT+AAV, AS+AAV) в дни после рождения 0-2. **Панель А** показывает схему экспериментальной временной шкалы. **Панель В** суммирует эксперименты в открытом поле, проверяющие двигательную активность. Данные отображаются как в 5-минутных ячейках (левая панель), так и в виде общей суммы активности за 1-часовой сеанс записи (правая панель). Статистически значимого снижения между мышами AS+носитель и WT+носитель, как сообщалось ранее, не наблюдалось, хотя была очевидна тенденция, которая, по-видимому, не устранялась у мышей AS+AAV. Примечательно, что мыши WT+AAV демонстрируют умеренную гиперактивность, потенциальный побочный эффект сверхэкспрессии UBE3A. **Панель С**

показывает результаты анализа моторных характеристик на вращающемся барабане, который проводят в два отдельных дня: день 1, состоящий из трех опытно-методических испытаний; день 2, через 48 часов, состоящий из 2 повторных испытаний. Все испытания длятся 5 минут. В отличие от мышей AS+носитель, мыши AS+AAV значительно преодолели свои двигательные недостатки во время опытно-методических испытаний, приближаясь к уровням эффективности контрольной группы WT+носитель, которые сохранялись во время повторного тестирования. **Панель D** показывает результаты теста «закапывания шариков», который измеряет самопроизвольное рытье и рытье норы. Мыши AS+носитель обычно закапывали очень мало шариков в течение 30-минутного сеанса, что указывает на серьезный дефицит этого этологически значимого поведения. Этот фенотип был частично, если не полностью, сохранен у большинства мышей AS+AAV. **Панель E** демонстрирует, что обработка PHP.B/hUBE3A значительно улучшает гнездование - еще одно врожденное поведение, в значительной степени отсутствующее у мышей AS - в группе AS+AAV. Мыши AS, обработанные PHP.B/hUBE3A, включили в свои гнезда больше доступного материала для гнезд (левая панель) и сделали гнезда более высокого качества, чем их аналоги, обработанные носителем.

На **ФИГ. 11** показаны результаты тестирования флуротилового киндлинга и провокационной пробы в модели взрослых мышей WT и AS с ICV инъекцией либо носителя (WT+носитель, AS+носитель), либо вируса генной терапии PHP.B/hUBE3A AS (WT+AAV, AS+AAV) в дни после рождения 0-2. **Панель A** показывает схему экспериментальной временной шкалы. **Панель B** суммирует средние групповые латентности до миоклонического (левая панель) и генерализованного приступа (правая панель) в течение 8-дневного периода флуротил киндлинга и последующей провокационной пробы флуротила на 36 день. Мыши AS+носитель имели сильную тенденцию к снижению порогов миоклонических приступов (MST) и порогов генерализованных приступов (GST) при провокационной пробе. Пороги судорожных приступов были нормализованы в группе AS+AAV, что демонстрирует потенциал генной терапии AS для защиты от чрезмерного эпилептогенеза.

На **ФИГ. 12** показаны анатомические корреляты повышенной восприимчивости к приступам после флуротилового киндлинга приступов. **Панель A** показано WFA окрашивание перинейрональной сети (пурпурный) в сагиттальных срезах дорсального гиппокампа. Количественная оценка средней флуоресценции WFA в зубчатой извилине подтвердила, что усиленное отложение перинейрональной сети в этой структуре было уникальным для мышей AS+носитель. **Панель B** показывает GFAP окрашивание астроцитов в сагиттальных срезах, охватывающих гиппокамп и кору. Интенсивно окрашенные астроциты в гиппокампе свидетельствуют о реактивном астроглиозе - отличительном признаке височной эпилепсии - и наблюдаются только в группе AS+носитель, что продемонстрировано количественной оценкой средней флуоресценции GFAP гиппокампа.

На **ФИГ. 13** показаны кодирующие последовательности WT (нативные) для ORF

UBE3A, которые кодируют как изоформу 3, так и изоформу 1 UBE3A человека, с последовательностями Козака WT (SEQ ID NO: 26). Последовательности Козака, регулирующие соответствующие экспрессируемые изоформы, выделены жирным шрифтом, сайты начала трансляции подчеркнуты.

На **ФИГ. 14** показаны кодирующие последовательности WT (нативные) для ORF UBE3A, которые кодируют как изоформу 3 UBE3A человека, так и изоформу 1, с модифицированными последовательностями Козака (SEQ ID NO: 27). Последовательности Козака, регулирующие соответствующие экспрессируемые изоформы, выделены жирным шрифтом, сайты начала трансляции подчеркнуты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение более подробно поясняется ниже. Это описание не предназначено для того, чтобы быть подробным каталогом всех различных способов, которыми может быть реализовано изобретение, или всех функций, которые могут быть добавлены к настоящему изобретению. Например, признаки, проиллюстрированные в отношении одного варианта осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, а признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть исключены из этого варианта осуществления. Кроме того, многочисленные изменения и дополнения к различным вариантам осуществления, предложенным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия, которое не отклоняется от настоящего изобретения. Следовательно, нижеследующее описание предназначено для иллюстрации некоторых конкретных вариантов осуществления изобретения, а не для исчерпывающего определения всех их перестановок, комбинаций и вариаций.

Если контекст не указывает иное, конкретно подразумевается, что различные признаки изобретения, описанные в данном документе, могут использоваться в любой комбинации. Кроме того, настоящее изобретение также предполагает, что в некоторых вариантах осуществления изобретения любая особенность или комбинация признаков, изложенных в настоящем документе, может быть исключена или опущена. Для иллюстрации, если в описании указано, что комплекс включает компоненты А, В и С, конкретно подразумевается, что любой из А, В или С, или их комбинация, может быть опущен и исключен отдельно или в любой комбинации.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение. Терминология, используемая в описании изобретения в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения изобретения.

Нуклеотидные последовательности представлены в настоящем документе только одной цепью в направлении от 5' до 3' слева направо, если специально не указано иное. Нуклеотиды и аминокислоты представлены в настоящем документе способом, рекомендованным IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, или (для

аминокислот) либо однобуквенным, либо трехбуквенным кодом, оба в соответствии с 37 C.F.R. §1.822 и налаженным использованием.

Если не указано иное, стандартные способы, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для получения рекомбинантных и синтетических полипептидов, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, манипулирования последовательностями нуклеиновых кислот, получения трансформированных клеток, конструирования конструкций гAAV, модифицированных капсидных белков, упаковочных векторов, экспрессирующих последовательности гер и/или сар AAV, и временно и стабильно трансфицированных упаковывающих клеток. Такие способы известны специалистам в данной области. *См., например, SAMBROOK et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. AUSUBEL et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York).*

Все публикации, заявки на патенты, патенты, нуклеотидные последовательности, аминокислотные последовательности и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки.

Определения

Используемые в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа предназначены для включения также форм множественного числа, если контекст явно не указывает иное.

Используемый в настоящем документе термин «и/или» относится и охватывает любые и все возможные комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в альтернативе («или»).

Кроме того, настоящее изобретение также предполагает, что в некоторых вариантах осуществления изобретения любой признак или комбинация признаков, изложенных в настоящем документе, может быть исключена или опущена.

Кроме того, термин «примерно», используемый в настоящем описании при ссылке на измеряемую величину, такую как количество соединения или агента по настоящему изобретению, доза, время, температура и подобные, предназначен для охвата вариантов из $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, или даже $\pm 0,1\%$ от указанного количества.

В настоящем контексте переходная фраза «состоящий по существу из» должна интерпретироваться как охватывающая перечисленные материалы или стадии, а также те, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного изобретения. Таким образом, используемый в настоящем документе термин «состоящий по существу из» не следует интерпретировать как эквивалент «содержащий».

Термин «состоит по существу из» (и грамматических вариантов) в применении к полинуклеотидной или полипептидной последовательности по настоящему изобретению означает полинуклеотид или полипептид, который состоит как из указанной последовательности (*например, SEQ ID NO*), так и в общей сложности из десяти или меньше (*например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10*) дополнительных нуклеотидов или

аминокислот на 5' и/или 3' или N-концевых и/или С-концевых концах указанной последовательности или между двумя концами (*например*, между доменами), так что функция полинуклеотида или полипептида существенно не изменяется. Всего десять или менее дополнительных нуклеотидов или аминокислот включает общее количество дополнительных нуклеотидов или аминокислот, добавленных вместе. Термин «существенно измененный» в применении к полинуклеотидам по изобретению относится к увеличению или уменьшению способности экспрессировать кодированный полипептид на, по меньшей мере, примерно 50% или более по сравнению с уровнем экспрессии полинуклеотида, состоящего из указанной последовательности. Термин «существенно измененный» применительно к полипептидам по изобретению относится к увеличению или уменьшению биологической активности на, по меньшей мере, примерно 50% или более по сравнению с активностью полипептида, состоящего из указанной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин «парвовирус» охватывает семейство Parvoviridae, включая автономно реплицирующиеся парвовирусы и зависимые вирусы. Автономные парвовирусы включают представителей родов Parvovirus, Erythrovirus, Densovirus, Iteravirus и Contravirus. Типовые автономные парвовирусы включают, но не ограничиваются ими, мелкий вирус мышей, парвовирус крупного рогатого скота, парвовирус собак, парвовирус курицы, вирус панлейкопении кошек, парвовирус кошек, парвовирус гуся, парвовирус H1, парвовирус мускусной утки, парвовирус змей и вирус B19. Другие автономные парвовирусы известны специалистам в данной области техники. См., *например*, FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers).

Род Dependovirus содержит аденоассоциированные вирусы (AAV), включая, но не ограничиваясь ими, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV птиц, AAV крупного рогатого скота, AAV собак, AAV коз, AAV змей, AAV лошадей и AAV овец. См., *например*, FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers); и **Таблицу 1**.

Термин «аденоассоциированный вирус» (AAV) в контексте настоящего изобретения включает без ограничения AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV птиц, AAV крупного рогатого скота, AAV собак, AAV лошадей, AAV овец и любых других AAV, известных в настоящее время или обнаруженных позднее. См., *например*, BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). Был идентифицирован ряд дополнительных серотипов и клад AAV (см., *например*, Gao et al., (2004) J. Virol. 78:6381-6388 и **таблицу 1**), которые также охватываются термином «AAV».

Частицы и геномы парвовируса по настоящему изобретению могут происходить из AAV, но не ограничиваются ими. Геномные последовательности различных серотипов

AAV и автономных парвовирусов, а также последовательности нативных ITR, белков Rep и субъединиц капсида известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. *См., например,* номера доступа GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, AY631966, AX753250, EU285562, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852 и AY530579; описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки для изучения последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот парвовируса и AAV. *См. также, например,* Bantel-Schaal et al., (1999) J. Virol. 73: 939; Chiorini et al., (1997) J. Virol. 71:6823; Chiorini et al., (1999) J. Virol. 73:1309; Gao et al., (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854; Moris et al., (2004) Virol. 33:375-383; Mori et al., (2004) Virol. 330:375; Muramatsu et al., (1996) Virol. 221:208; Ruffing et al., (1994) J. Gen. Virol. 75:3385; Rutledge et al., (1998) J. Virol. 72:309; Schmidt et al., (2008) J. Virol. 82:8911; Shade et al., (1986) J. Virol. 58:921; Srivastava et al., (1983) J. Virol. 45:555; Xiao et al., (1999) J. Virol. 73:3994; международные патентные публикации WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; и патент США № 6,156,303; описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки для изучения последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот парвовируса и AAV. *См. также Таблицу 1.* Раннее описание ITR-последовательностей AAV1, AAV2 и AAV3 предоставлено Xiao, X., (1996), "Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration," Ph.D. Dissertation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA (включен в настоящий документ полностью).

«Химерная» последовательность, кодирующая капсид нуклеиновой кислоты AAV, или капсидный белок AAV является последовательностью, которая объединяет части двух или нескольких последовательностей капсида. «Химерный» вирион или частица AAV содержит химерный капсидный белок AAV.

Используемый в настоящем документе термин «тропизм» относится к предпочтительной, но не обязательно исключительной, пенетрантности вектора (*например*, вирусного вектора) в определенные клетки или типы тканей и/или предпочтительному, но не обязательно исключительному, взаимодействию с поверхностью клетки, которое облегчает проникновение в определенные типы клеток или тканей, необязательно и предпочтительно с последующей экспрессией (*например*, транскрипцией и, необязательно, трансляцией) последовательностей, переносимых содержащим вектора (*например*, вирусным геномом) в клетке, *например*, для рекомбинантного вируса, экспрессией гетерологичной нуклеотидной последовательности. Специалисты в данной области техники поймут, что транскрипция гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты из вирусного генома не может быть инициирована в отсутствие транс-действующих факторов, *например*, для индуцируемого промотора или иным образом регулируемой последовательности нуклеиновой кислоты. В

случае генома rAAV экспрессия гена вирусного генома может происходить из стабильно интегрированного провируса и/или из не интегрированной эписомы, а также из любой другой формы, которую вирусная нуклеиновая кислота может принимать внутри клетки.

Термин «профиль тропизма» относится к типу трансдукции одной или нескольких клеток-мишеней, тканей и/или органов. Типовые примеры химерных капсидов AAV имеют профиль тропизма, характеризующийся эффективной трансдукцией клеток центральной нервной системы (ЦНС) только с низкой трансдукцией периферических органов (см., например, патент США № 9,636,370 McCown et al. и патентную публикацию США 2017/0360960 Gray et al.). Векторы (*например*, вирусные векторы, *например*, капсиды AAV), экспрессирующие специфические профили тропизма, могут называться «тропными» из-за их профиля тропизма, *например*, нейротропными, печеночно-тропными и *т.д.*

Таблица 1

Серотипы/изоляты AAV	Номер доступа GenBank	Серотипы/изоляты AAV	Номер доступа GenBank	Серотипы/изоляты AAV	Номер доступа GenBank
Клональные изоляты		Xy S17	AY695376	Cy3	AY243019
AAV ATCC VR-865 птиц	AY186198, AY629583, NC_004828	Xy T88	AY695375	Cy5	AY243017
Штамм AAV DA-1 птиц	NC_006263, AY629583	Xy T71	AY695374	Rh13	AY243013
AAV крупного рогатого скота	NC_005889, AY388617	Xy T70	AY695373		
AAV4	NC_001829	Xy T40	AY695372	Клада E	
AAV5	AY1806	Xy T32	AY695371	Rh38	AY53055

	5, AF08571 6				8
Rh34	AY2430 01	Xy T17	AY695370	Hu66	AY53062 6
Rh33	AY2430 02	Xy LG15	AY695377	Hu42	AY53060 5
Rh32	AY2430 03			Hu67	AY53062 7
AAV10	AY6319 65	Клада С		Hu40	AY53060 3
AAV11	AY6319 66	AAV 3	NC_00172 9	Hu41	AY53060 4
AAV12	DQ8136 47	AAV 3B	NC_00186 3	Hu37	AY53060 0
AAV13	EU28556 2	Hu9	AY530629	Rh40	AY53055 9
		Hu10	AY530576	Rh2	AY24300 7
Клада А		Hu11	AY530577	Bb1	AY24302 3
AAV1	NC_0020 77, AF06349 7	Hu53	AY530615	Bb2	AY24302 2
AAV6	NC_0018 62	Hu55	AY530617	Rh10	AY24301 5
Hu.48	AY5306 11	Hu54	AY530616	Hu17	AY53058 2
Xy 43	AY5306 06	Hu7	AY530628	Hu6	AY53062 1
Xy 44	AY5306 07	Hu18	AY530583	Rh25	AY53055 7
Xy 46	AY5306	Hu15	AY530580	Pi2	AY53055

	09				4
		Hu16	AY530581	Pi1	AY530553
Клада В		Hu25	AY530591	Pi3	AY530555
Hu19	AY530584	Hu60	AY530622	Rh57	AY530569
Hu20	AY530586	Ch5	AY243021	Rh50	AY530563
Hu23	AY530589	Hu3	AY530595	Rh49	AY530562
Hu22	AY530588	Hu1	AY530575	Hu39	AY530601
Hu24	AY530590	Hu4	AY530602	Rh58	AY530570
Hu21	AY530587	Hu2	AY530585	Rh61	AY530572
Hu27	AY530592	Hu61	AY530623	Rh52	AY530565
Hu28	AY530593			Rh53	AY530566
Hu29	AY530594	Клада D		Rh51	AY530564
Hu63	AY530624	Rh62	AY530573	Rh64	AY530574
Hu64	AY530625	Rh48	AY530561	Rh43	AY530560
Hu13	AY530578	Rh54	AY530567	AAV8	AF513852
Hu56	AY530618	Rh55	AY530568	Rh8	AY242997
Hu57	AY530619	Cy2	AY243020	Rh1	AY530556
Hu49	AY5306	AAV7	AF513851		

	12				
Hu58	AY5306 20	Rh35	AY243000	Клада F	
Hu34	AY5305 98	Rh37	AY242998	AAV9 (Hu14)	AY53057 9
Hu35	AY5305 99	Rh36	AY242999	Hu31	AY53059 6
AAV2	NC_0014 01	Cy6	AY243016	Hu32	AY53059 7
Hu45	AY5306 08	Cy4	AY243018		
Hu47	AY5306 10				
Hu51	AY5306 13				
Hu52	AY5306 14				
Xy T41	AY6953 78				

Термин «нарушение, связанное с aberrантной экспрессией гена UBE3A» в контексте настоящего описания относится к заболеванию, нарушению, синдрому или состоянию, которое вызвано или является симптомом сниженной или измененной экспрессии гена UBE3A у субъекта относительно уровня экспрессии у нормального субъекта или в популяции.

Термин «нарушение, связанное с aberrантной активностью продукта гена UBE3A» в контексте настоящего описания относится к заболеванию, нарушению, синдрому или состоянию, которое вызвано или является симптомом снижения или изменения активности продукта гена UBE3A у субъекта по сравнению с активностью у обычного субъекта или в популяции. В некоторых вариантах осуществления, нарушение, связанное с aberrантной активностью продукта гена UBE3A, может быть синдромом Эйнджелмена.

Синдром Эйнджелмена (AS) представляет собой моногенное нарушение, вызванное делециями или мутациями в материнском аллеле UBE3A. Интактный отцовский аллель подавляется в нейронах здоровых пациентов и пациентов с AS антисмысловым ДНК транскриптом UBE3A-ATS, как показано на **ФИГ. 1**. Существует три изоформы белка UBE3A человека (**ФИГ. 3A**). Самая короткая (*т.е.* изоформа 1 человека) обладает уникальной способностью локализоваться в ядре и экспрессируется в избытке по сравнению с двумя длинными изоформами - изоформами 2 и 3 человека - которые

отличаются аминокислотными удлинениями, которые совпадают с N-концом длинной изоформы 2 мыши (Miao et al, J Neuroscience, 2013;33(1):327-333). Было показано, что мыши с дефицитом короткой изоформы (изоформа 3 у мышей; ISO3-KO) широко фенотипируют электрофизиологические и поведенческие дефициты у мышей с моделью AS (Avagliano et al., Nat Neurosci, 2019;22(8):1235-1247). Совсем недавно изобретатели продемонстрировали, что мыши ISO3-KO, аналогичные мышам AS (Gu et al, J Clin Invest, 2019;129(1):163-168), демонстрируют повышенную чувствительность к повторному вызову приступа после флуоротилового киндинга. Напротив, дополнительная модель мыши, несущей селективную делецию длинной изоформы UBE3A (изоформа 2 у мышей; ISO2-KO), до сих пор не смогла экспрессировать какие-либо фенотипы мыши AS (**ФИГ. 2В**; Avagliano et al., Nat Neurosci, 2019;22(8):1235-1247). Недавние клинические данные также подтверждают критическую важность короткой UBE3A, но позволяют предположить, что длинная UBE3A также способствует здоровому развитию и функционированию мозга, несмотря на то, что он экспрессируется на более низких уровнях (Sadhvani et al, Am J Med Genet A, 2018;176(7):1641-1647). Не желая быть связанными с теорией, соотношения эндогенной экспрессии коротких и длинных изоформ UBE3A из экзогенно добавленной кассеты экспрессии можно приблизительно оценить путем модулирования относительной силы или слабости последовательностей Козака, управляющих их трансляцией.

В контексте настоящего документа, последовательность Козака относится к нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотиды, расположенные выше, ниже, и включающие кодон начала/инициации (*m.e.* сайт начала трансляции). Последовательность Козака распознается рибосомой как сайт начала трансляции. Вариации последовательности (например, путем естественных и/или антропогенных модификаций) известной консенсусной последовательности Козака (например, gccRccAUGG (SEQ ID NO: 24)) могут изменяться по силе инициации (*см. ФИГ. 3С* консенсусной последовательности Козака), где подчеркнутые нуклеотиды обозначают кодон начала/инициации, прописные буквы обозначают высококонсервативные основания, R обозначают консервативный пурин (чаще всего аденин), а строчные буквы обозначают общие, но переменные основания. Известная консенсусная последовательность Козака является консенсусным представителем наиболее распространенного нуклеотида в каждом положении на основе множества мРНК человека; нативные/дикого типа последовательности Козака отдельного гена и/или открытой рамки считывания могут варьироваться. Как известно в данной области техники, нуклеотид тимидина (Т) в последовательности ДНК соответствует (*например*, транскрибируется как) нуклеотиду уридина (U) в соответствующей мРНК (*например*, иницирующий кодон ДНК ATG соответствует мРНК AUG и т. д.). Любая последовательность, описанная в настоящем документе, считается описанием как Т, так и U для ДНК и РНК, соответственно.

Используемый в настоящем документе термин «трансдукция» клетки вирусным

вектором (*например*, вектором AAV) означает проникновение вектора в клетку и перенос генетического материала в клетку путем включения нуклеиновой кислоты в вирусный вектор и последующего переноса в клетку через вирусный вектор.

Если не указано иное, «эффективная трансдукция» или «эффективный тропизм» или аналогичные термины могут быть определены путем ссылки на подходящий положительный или отрицательный контроль (*например*, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или более трансдукции или тропизма, соответственно, положительного контроля, или, по меньшей мере, примерно 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 500%, 1000% или более трансдукции или тропизма, соответственно отрицательного контроля).

Аналогично, можно определить, если вирус «не эффективно трансдуцирует» или «не имеет эффективного тропизма» для ткани-мишени, или аналогичные термины, со ссылкой на подходящий контроль. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор не трансдуцирует эффективно (*т.е.* не обладает эффективным тропизмом) ткани вне ЦНС, *например* печень, почки, гонады и/или половые клетки. В конкретных вариантах осуществления, нежелательная трансдукция тканей (*например*, печени) составляет 20% или меньше, 10% или меньше, 5% или меньше, 1% или меньше, 0,1% или меньше от уровня трансдукции желаемых тканей-мишеней (*например*, клеток ЦНС).

Термины «5' часть» и «3' часть» являются относительными терминами для определения пространственного отношения между двумя или несколькими элементами. Таким образом, *например*, «3' часть» полинуклеотида указывает сегмент полинуклеотида, расположенный ниже другого сегмента. Термин «3' часть» не предназначен для обозначения того, что сегмент обязательно находится на 3' конце полинуклеотида или даже что он обязательно находится на 3' половине полинуклеотида, хотя это может быть. Аналогично, «5' часть» полинуклеотида указывает сегмент полинуклеотида, расположенный выше другого сегмента. Термин «5' часть» не предназначен для обозначения того, что сегмент обязательно находится на 5' конце полинуклеотида или даже что он обязательно находится на 5' половине полинуклеотида, хотя это может быть.

Используемый в настоящем документе термин «полипептид» охватывает как пептиды, так и белки, если не указано иное.

«Полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» или «нуклеотидная последовательность» могут представлять собой гибридные последовательности РНК, ДНК или ДНК-РНК (включая как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды), но предпочтительно являются одноцепочечной или двухцепочечной последовательностью ДНК.

Термин «регуляторный элемент» относится к генетическому элементу, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. *Например*, промотором является регуляторный элемент, который способствует инициации транскрипции функционально связанной кодирующей области. Другими регуляторными элементами являются сигналы сплайсинга, сигналы полиаденилирования, сигналы

терминации и т. д. Область в последовательности нуклеиновой кислоты или полинуклеотиде, в которой обнаружены один или несколько регуляторных элементов, может называться «регуляторной областью».

Используемый в настоящем документе в отношении нуклеиновых кислот термин «функционально связанная» относится к функциональной связи между двумя или более нуклеиновыми кислотами. Например, промоторная последовательность может быть описана как «функционально связанная» с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, поскольку промоторная последовательность инициирует и/или опосредует транскрипцию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные последовательности нуклеиновых кислот являются непрерывными и/или находятся в одной рамке считывания.

Термин «открытая рамка считывания (ORF)» в контексте настоящего описания относится к части полинуклеотида (*например*, гена), которая кодирует полипептид, и включает сайт начала инициации (*т.е.* последовательность Козака), который инициирует транскрипцию полипептида. Термин «кодирующая область» может использоваться взаимозаменяемо с открытой рамкой считывания.

Термин «кодон-оптимизированная» в контексте настоящего описания относится к кодирующей последовательности гена, которая была оптимизирована для увеличения экспрессии путем замены одного или нескольких кодонов, обычно присутствующих в кодирующей последовательности (*например*, в последовательности дикого типа, включая, *например*, кодирующую последовательность для UBE3A) на кодон той же аминокислоты. Это называется синонимичным кодоном. Таким образом, белок, кодированный геном, идентичен, но основная последовательность азотистых оснований гена или соответствующей мРНК отличается. В некоторых вариантах осуществления, оптимизация заменяет один или несколько редких кодонов (то есть кодонов для тРНК, которые относительно редко встречаются в клетках определенного вида) синонимичными кодонами, которые встречаются чаще, для повышения эффективности трансляции. Например, при кодон-оптимизации у человека, один или несколько кодонов в кодирующей последовательности заменяют кодонами, которые чаще встречаются в клетках человека для той же аминокислоты. Оптимизация кодонов также может увеличить экспрессию генов с помощью других механизмов, которые могут повысить эффективность транскрипции и/или трансляции. Стратегии включают, без ограничений, увеличение общего содержания GC (то есть доли гуанинов и цитозинов во всей кодирующей последовательности), уменьшение содержания CpG (то есть количества CG или GC динуклеотидов в кодирующей последовательности), удаление криптоических донорных или акцепторных сайтов сплайсинга и/или добавление или удаление сайтов связывания рибосомы и/или сайтов инициации, таких как последовательности Козака. Желательно, чтобы кодон-оптимизированный ген проявлял улучшенную экспрессию белка, например, кодированный им белок экспрессировался на определимо более высоком уровне в клетке по сравнению с уровнем экспрессии белка, обеспечиваемого геном дикого

типа в другой подобной клетке. Оптимизация кодонов также обеспечивает возможность отличать кодон-оптимизированный ген и/или соответствующую мРНК от эндогенного гена и/или соответствующей мРНК *in vitro* или *in vivo*.

Используемый в настоящем документе термин «идентичность последовательности» имеет стандартное значение в данной области техники. Как известно в данной области техники, можно использовать ряд различных программ для определения того, имеет ли полинуклеотид или полипептид идентичность последовательности или сходство с известной последовательностью. Идентичность или сходство последовательностей можно определить с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, алгоритм идентичности локальной последовательности Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритм выравнивания идентичности последовательности Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), способ поиска сходства Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), программу последовательности Best Fit, описанную Devereux et al., *Nucl. Acid Res.* 12:387 (1984), предпочтительно с использованием настроек по умолчанию или путем проверки.

Примером полезного алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей, используя прогрессивные попарные выравнивания. Он также может построить дерево, показывающее отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощенный способ прогрессивного выравнивания Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351 (1987); способ, аналогичный описанному Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151 (1989).

Другим примером полезного алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990) and Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873 (1993). Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная от Altschul et al., *Meth. Enzymol.*, 266:460 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.html. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, для которых предпочтительно установлены значения по умолчанию. Параметры являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой выполняется поиск представляющей интерес последовательности; однако значения можно отрегулировать для увеличения чувствительности.

Дополнительным полезным алгоритмом является гэпированный BLAST, как сообщается Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389 (1997).

Значение доли идентичности аминокислотной последовательности определяют числом совпадающих идентичных остатков, деленным на общее количество остатков «более длинной» последовательности в выровненной области. «Более длинной»

последовательностью является последовательность, имеющая наиболее актуальные остатки в выровненной области (гэпы, введенные WU-Blast-2 для максимизации оценки выравнивания, игнорируются).

Подобным образом доля идентичности последовательности нуклеиновой кислоты определяется как доля нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидам в полинуклеотиде, конкретно описанном в настоящем документе.

Выравнивание может включать введение гэпов в выравниваемых последовательностях. Кроме того, для последовательностей, которые содержат больше или меньше нуклеотидов, чем полинуклеотиды, конкретно описанные в настоящем документе, следует понимать, что, в одном варианте осуществления, доля идентичности последовательностей будет определяться на основе количества идентичных нуклеотидов по отношению к общему количеству нуклеотидов. Таким образом, например, идентичность последовательностей более коротких, чем последовательность, конкретно описанная в настоящем документе, будет определяться с использованием количества нуклеотидов в более короткой последовательности, в одном варианте осуществления. В расчетах доли идентичности относительный вес не присваивается различным проявлениям вариации последовательностей, таким как вставки, делеции, замены и *т. д.*

В одном варианте осуществления, только идентичности оцениваются положительно (+1), и всем формам изменения последовательности, включая гэпы, присваивается значение «0», что устраняет необходимость во взвешенной шкале или параметрах, как описано ниже, для вычислений сходства последовательностей. Доля идентичности последовательностей может быть вычислена, например, путем деления количества совпадающих идентичных остатков на общее количество остатков «более короткой» последовательности в выровненной области и умножения на 100. «Более длинной» последовательностью является последовательность, имеющая наибольшее количество фактических остатков в выровненной области.

Используемый в настоящем документе термин «выделенная» нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность (*например*, «выделенная ДНК» или «выделенная РНК») означает нуклеиновую кислоту или нуклеотидную последовательность, отделенную или по существу свободную от, по меньшей мере, некоторых других компонентов природного организма или вируса, например клеточных или вирусных структурных компонентов или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно связанных с нуклеиновой кислотой или нуклеотидной последовательностью.

Аналогично, «выделенный» полипептид означает полипептид, который отделен или по существу не содержит, по меньшей мере, некоторых других компонентов существующего в природе организма или вируса, например, структурных компонентов клетки или вируса или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно связанных с полипептидом.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированный» в

применении к полинуклеотидной или полипептидной последовательности относится к последовательности, которая отличается от последовательности дикого типа из-за одной или нескольких делеций, добавлений, замен или любой их комбинации.

Используемый в настоящем документе термин «изолят» (или грамматические эквиваленты) вирусного вектора означает, что вирусный вектор, по меньшей мере, частично отделен от, по меньшей мере, некоторых других компонентов в исходном материале.

Термины «лечить», «лечение» или «лечение» (или грамматически эквивалентные термины) означают уменьшение или, по меньшей мере, частичное улучшение или облегчение тяжести состояния субъекта и/или облегчение, смягчение или уменьшение, по меньшей мере, один клинический симптом и/или отсрочку прогрессирования состояния.

Используемый в настоящем документе термин «предотвращать», «предотвращает» или «профилактика» (и их грамматические эквиваленты) означает задерживать или ингибировать начало заболевания. Эти термины не предназначены для полной отмены заболевания и охватывают любой тип профилактического лечения для снижения частоты возникновения состояния или отсрочки возникновения состояния.

«Терапевтически эффективным» количеством, используемым в настоящем документе, является количество, которое достаточно для обеспечения некоторого улучшения или пользы для субъекта. Альтернативно заявлено, что «терапевтически эффективным» количеством является количество, которое обеспечит некоторое облегчение, смягчение, уменьшение или стабилизацию, по меньшей мере, одного клинического симптома у субъекта. Специалисты в данной области техники поймут, что терапевтические эффекты не обязательно должны быть полными или лечебными, пока субъект получает некоторую пользу.

«Эффективное для профилактики» количество, используемое в настоящем документе, является количеством, которое достаточным для профилактики и/или отсрочки начала заболевания, нарушения и/или клинических симптомов у субъекта и/или для уменьшения и/или отсрочки тяжести начала заболевания, нарушения и/или клинических симптомов у субъекта по сравнению с тем, что могло бы возникнуть в отсутствие способов по настоящему изобретению. Специалисты в данной области техники поймут, что уровень профилактики не обязательно должен быть полным, если субъекту предоставляется некоторая польза.

Термин «гетерологичный», используемый для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка, означает, что нуклеиновая кислота или белок произошли от другого организма или другого вида того же организма, чем клетка-хозяин или субъект, в котором они экспрессируются. Термин «гетерологичный», при использовании по отношению к белку или нуклеиновой кислоте в плазмиде, кассете экспрессии или векторе, указывает, что белок или нуклеиновая кислота присутствует с другой последовательностью или подпоследовательностью, с которой рассматриваемый белок или нуклеиновая кислота не встречается в природе. Обычно гетерологичной нуклеиновой

кислотой является представляющая интерес нуклеиновая кислота, которая содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, и/или содержит нетранслируемую РНК, каждая из которых может называться в настоящем документе «трансгеном». Представляющая интерес нуклеиновая кислота может кодировать терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, или диагностический полипептид, или диагностическую РНК. Представляющая интерес нуклеиновая кислота/гетерологичная нуклеиновая кислота часто находится в контексте кассеты экспрессии.

Используемый в настоящем документе термин «кассета экспрессии» включает представляющую интерес нуклеиновую кислоту, функционально связанную/ассоциированную с соответствующими последовательностями регуляторных элементов (регуляторными элементами), например, сигналы контроля транскрипции/трансляции, точки начала репликации, сигналы полиаденилирования, внутренние участки посадки рибосомы (IRES), промоторы и/или энхансеры и подобные. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кассета экспрессии содержит промотор (например, эукариотический), функционально связанный с представляющей интерес нуклеиновой кислотой, и необязательно (эукариотическую) последовательность терминации транскрипции. Обычно кассета экспрессии находится в контексте вектора (например, фланкируется последовательностями вектора). В контексте вирусного вектора она обычно фланкируется вирусными сигналами упаковки для вирусных векторов. Например, для вирусного вектора AAV сигналами упаковки являются, по меньшей мере, один инвертированный концевой повтор, который расположен рядом с кассетой экспрессии, необязательно 5' инвертированный концевой повтор (ITR) и 3' ITR, фланкируют кассету экспрессии.

«Вектор» относится к соединению, используемому в качестве носителя для переноса чужеродного генетического материала в другую клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. Вектор клонирования, содержащий чужеродную нуклеиновую кислоту, называется рекомбинантным вектором. Примерами векторов нуклеиновых кислот являются плазмиды, вирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Рекомбинантные векторы обычно содержат точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селектируемый маркер. Последовательность нуклеиновой кислоты обычно состоит из вставки (рекомбинантной нуклеиновой кислоты или трансгена) и более крупной последовательности, которая служит «скелетом» вектора. Целью вектора, который передает генетическую информацию в другую клетку, обычно является выделение, размножение или экспрессия вставки в клетке-мишени. Векторы экспрессии (конструкции экспрессии) предназначены для экспрессии экзогенного гена в клетке-мишени и обычно имеют промоторную последовательность, которая управляет экспрессией экзогенного гена/ORF. Вставка вектора в клетку-мишень называется трансформацией или трансфекцией бактериальных и эукариотических клеток, хотя вставка вирусного вектора часто называется трансдукцией.

Термин «вектор» также может использоваться в целом для описания элементов, которые служат для переноса чужеродного генетического материала в другую клетку, например, но не ограничиваясь ими, трансформированную клетку или наночастицу.

Используемые в настоящем документе термины «вектор», «вирусный вектор», «вектор доставки» (и аналогичные термины) в конкретном варианте осуществления обычно относятся к вирусной частице, которая функционирует как средство доставки нуклеиновой кислоты и которая содержит вирусную нуклеиновую кислоту. (*т.е.* векторный геном), упакованный внутри вириона. Вирусные векторы по настоящему изобретению содержат химерный AAV капсид по изобретению и могут упаковывать геном AAV или гAAV или любую другую нуклеиновую кислоту, включая вирусные нуклеиновые кислоты. Альтернативно, в некоторых контекстах, термин «вектор», «вирусный вектор», «вектор доставки» (и аналогичные термины) может использоваться для обозначения генома вектора (*например*, вДНК) в отсутствие вириона, и/или вирусный капсид, который действует как переносчик для доставки молекул, связанных с капсидом или упакованных внутри капсида.

Вирусными векторами по изобретению могут также являться дуплексные парвовирусные частицы, как описано в международной патентной публикации WO 01/92551 (описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, могут быть упакованы двухцепочечные (дуплексные) геномы.

«Геномом вектора рекомбинантного AAV» или «геномом гAAV» является геном AAV (*т.е.* вДНК), который содержит, по меньшей мере, один инвертированный концевой повтор (*например*, один, два или три инвертированных концевых повтора) и одну или несколько гетерологичных нуклеотидных последовательностей. гAAV векторы обычно сохраняют 145 концевых повторов (TR) *in cis* для генерации вируса; однако модифицированные AAV TR и не-AAV TR, включая частично или полностью синтетические последовательности, также могут служить этой цели. Все другие вирусные последовательности необязательны и могут поставляться *in trans* (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). гAAV вектор необязательно содержит два TR (*например*, AAV TR), которые обычно будут на 5' и 3' концах гетерологичной нуклеотидной последовательности, но не обязательно должны быть непрерывными с ней. TR могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Векторный геном может также содержать один ITR на своем 3' или 5' конце.

Термин «концевой повтор» или «ТР» включает любой вирусный концевой повтор или синтетическую последовательность, которая образует шпилечную структуру и действует как инвертированный концевой повтор (ITR) (*т. е.*, опосредует желаемые функции, такие как репликация, вирусная упаковка, интеграция и/или сохранение провируса и подобные). TR может быть TR AAV (именуемым в настоящем документе как AAV ITR) или не-AAV TR. Например, последовательность не-AAV TR (называемая в настоящем документе не-AAV ITR), такая как последовательности других парвовирусов

(например, парвовируса собак (CPV), парвовируса мыши (MVM), парвовируса человека B-19) или SV40 шпилька, которая служит источником репликации SV40, может использоваться как TR, который может быть дополнительно модифицирован усечением, заменой, делецией, вставкой и/или добавлением. Кроме того, TR (ITR) может быть частично или полностью синтетическим, таким как «двойная D-последовательность», как описано в патенте США № 5,478,745, Samulski et al.

Геномы парвовирусов имеют палиндромные последовательности как на 5', так и на 3' концах. Палиндромный характер последовательностей приводит к образованию шпильчатой структуры, которая стабилизируется за счет образования водородных связей между комплементарными парами оснований. Считается, что эта шпилька имеет «Y» или «T» форму. См., например, FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapters 69 & 70 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers).

«Инвертированный концевой повтор AAV» или «AAV ITR» может происходить из любого серотипа или изолята AAV, включая, помимо прочего, серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или любой другой AAV, известный в настоящее время или обнаруженный позже (см., например, **Таблицу 1**). AAV ITR не обязательно должен иметь нативный ITR (например, нативная последовательность ITR AAV может быть изменена путем вставки, удаления, усечения и/или миссенс-мутаций), пока ITR опосредует желаемые функции, например репликацию, упаковку вируса, интеграцию и/или сохранение провирусов и подобные.

Термины «гAAV частица» и «гAAV вирион» используют в настоящем документе как синонимы. «гAAV частица» или «гAAV вирион» включает геном вектора гAAV, упакованный внутри капсида AAV.

Вирусные векторы по изобретению могут дополнительно быть «таргетными» вирусными векторами (например, имеющими направленный тропизм) и/или «гибридными» парвовирусами (т.е. в которых вирусные ITR и вирусный капсид взяты из разных парвовирусов), как описано в международной патентной публикации WO 00/28004 и Chao et al., (2000) Mol. Therapy 2:619.

Кроме того, вирусный капсид или геномные элементы могут содержать другие модификации, включая вставки, делеции и/или замены.

Используемый в настоящем документе термин «аминокислота» охватывает любые встречающиеся в природе аминокислоты, их модифицированные формы и синтетические аминокислоты, включая не встречающиеся в природе аминокислоты.

Встречающиеся в природе левовращающие (L-) аминокислоты показаны в **таблице 2**.

Таблица 2

Аминокислотный остаток	Сокращенное название	
	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A

Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота (аспартат)	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота (глутамат)	Glu	E
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Альтернативно, аминокислота может быть модифицированным аминокислотным остатком (неограничивающие примеры показаны в **таблице 3**) или может быть аминокислотой, которая модифицирована пост-трансляционной модификацией (*например*, ацетилированием, амидированием, формилированием, гидроксилированием, метилированием, фосфорилированием или сульфатированием).

Таблица 3 : Производные аминокислотных остатков

Модифицированный аминокислотный остаток	Сокращение
2-аминоадипиновая кислота	Aad
3-аминоадипиновая кислота	bAad
бета-аланин, бета-аминопропионовая кислота	bAla
2-аминомасляная кислота	Abu
4-аминомасляная кислота, пиперидиновая кислота	4Abu
6-аминокапроновая кислота	Acp
2-аминогептановая кислота	Ahe
2-аминоизомасляная кислота	Aib
3-аминоизомасляная кислота	bAib

2-аминопимелиновая кислота	Apm
т-бутилаланин	t-BuA
Цитруллин	Cit
Циклогексилаланин	Cha
2,4-диаминомасляная кислота	Dbu
Десмозин	Des
2,2'-диаминопимелиновая кислота	Dpm
2,3-диаминопропионовая кислота	Dpr
N-этилглицин	EtGly
N-этиласпарагин	EtAsn
Гомоаргинин	hArg
Гомоцистеин	hCys
Гомосерин	hSer
Гидроксилизин	Hyl
LLO-Гидроксилизин	aHyl
3-гидроксипролин	3Hyp
4-гидроксипролин	4Hyp
Изодесмозин	Ide
алло-изолейцин	alle
Сульфоксид метионина	MSO
N-метилглицин, саркозин	MeGly
N-метилизолойцин	Melle
6-N-метиллизин	MeLys
N-метилвалин	MeVal
2-нафтилаланин	2-Nal
Норвалин	Nva
Норлейцин	Nle
Орнитин	Orn
4-хлорфенилаланин	Phe(4-Cl)
2-фторфенилаланин	Phe(2-F)
3-фторфенилаланин	Phe(3-F)
4-фторфенилаланин	Phe(4-F)
Фенилглицин	Phg
Бета-2-тиенилаланин	Thi

Кроме того, не существующая в природе аминокислота может быть аминокислотой

«не природного происхождения», как описано Wang et al., (2006) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35:225-49. Эти аминокислоты не природного происхождения могут быть успешно использованы для химического связывания представляющих интерес молекул с капсидным белком AAV.

Термин «матрица» или «субстрат» используется в настоящем документе для обозначения полинуклеотидной последовательности, которая может быть реплицирована с образованием вирусной ДНК парвовируса. В целях получения вектора, матрицу обычно встраивают в более крупную нуклеотидную последовательность или конструкцию, включая, но не ограничиваясь ими, плазмиду, вектор голой ДНК, искусственную бактериальную хромосому (BAC), искусственную дрожжевую хромосому (YAC) или вирусный вектор (*например*, аденовирус, вирус герпеса, вирус Эпштейн-Барр, AAV, бакуловирусные, ретровирусные векторы и подобные). Альтернативно, матрица может быть стабильно включена в хромосому упаковывающей клетки.

Используемый в настоящем документе термин «Rep кодирующие последовательности» парвовируса или AAV означает последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют не структурные белки парвовируса или AAV, которые опосредуют репликацию вируса и продукцию новых вирусных частиц. Гены и белки репликации парвовируса и AAV описаны в, *например*, FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapters 69 & 70 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers).

«Rep кодирующие последовательности» не обязательно должны кодировать все парвовирусные белки или белки Rep AAV. Например, в отношении AAV, Rep кодирующие последовательности не должны кодировать все четыре белка Rep AAV (Rep78, Rep 68, Rep52 и Rep40), фактически считается, что AAV5 экспрессирует только сплайсированные белки Rep68 и Rep40. В типовых вариантах осуществления, Rep кодирующие последовательности кодируют, по меньшей мере, те белки репликации, которые необходимы для репликации вирусного генома и упаковки в новые вирионы. Rep кодирующие последовательности обычно кодируют, по меньшей мере, один большой белок Rep (*например*, Rep78/68) и один малый белок Rep (*например*, Rep52/40). В конкретных вариантах осуществления, Rep кодирующие последовательности кодируют белок Rep78 AAV и белки Rep52 и/или Rep40 AAV. В других вариантах осуществления, Rep кодирующие последовательности кодируют белки Rep68 и Rep52 и/или Rep40. В еще одном варианте осуществления, Rep кодирующие последовательности кодируют белки Rep68 и Rep52, белки Rep68 и Rep40, белки Rep78 и Rep52 или белки Rep78 и Rep40.

Используемый в настоящем документе термин «большой белок Rep» относится к Rep68 и/или Rep78. Большие белки Rep по заявленному изобретению могут быть либо дикого типа, либо синтетическими. Большой белок Rep дикого типа может происходить из любого парвовируса или AAV, включая, помимо прочего, серотипы 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 13 или любой другой AAV, известный в настоящее время или обнаруженный позже (*см.*, *например*, **Таблицу 1**). Синтетический большой белок Rep может быть изменен вставкой, делецией, усечением и/или миссенс-мутациями.

Специалисты в данной области также поймут, что не обязательно, чтобы белки репликации кодировались одним и тем же полинуклеотидом. Например, для MVM белки NS-1 и NS-2 (которые являются вариантами сплайсинга) могут экспрессироваться независимо друг от друга. Аналогичным образом, для AAV промотор p19 может быть инактивирован, и большой белок Rep экспрессируется из одного полинуклеотида, а малый белок Rep экспрессируется из другого полинуклеотида. Однако обычно будет удобнее экспрессировать белки репликации из одной конструкции. В некоторых системах, вирусные промоторы (*например*, промотор p19 AAV) могут не распознаваться клеткой, и поэтому необходимо экспрессировать большие и малые белки Rep из отдельных кассет экспрессии. В других случаях, может быть желательно экспрессировать большие Rep и малые белки Rep отдельно, *т.е.* под контролем отдельных элементов контроля транскрипции и/или трансляции. Например, может быть желательно контролировать экспрессию больших белков Rep, чтобы уменьшить соотношение больших и малых белков Rep. В случае клеток насекомых, может быть выгодным подавление экспрессии больших белков Rep (*например*, Rep78/68) чтобы избежать токсичности для клеток (*см., например*, Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13:1935).

В настоящем документе «кодирующие кэп последовательности» парвовируса или AAV кодируют структурные белки, которые образуют функциональный капсид парвовируса или AAV (*т.е.* могут упаковывать ДНК и инфицировать клетки-мишени). Обычно последовательности, кодирующие кэп, будут кодировать все субъединицы капсида парвовируса или AAV, но менее чем все субъединицы капсида могут быть кодированы, пока продуцируется функциональный капсид. Обычно, но не обязательно, кодирующие кэп последовательности будут присутствовать на одной молекуле нуклеиновой кислоты.

Структура капсида автономных парвовирусов и AAV более подробно описана в BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapters 69 & 70 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers).

Под «по существу сохранять» свойство подразумевается, что, по меньшей мере, около 75%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% свойства (*например*, активности или другой измеряемой характеристики) сохраняется.

Кассеты экспрессии и векторы UBE3A

Настоящее изобретение относится к созданию кассеты экспрессии UBE3A для обеспечения терапевтических уровней внутриклеточной (*например*, не секреторной) экспрессии белка UBE3A (также известного как убиквитин-протеинлигаза E6AP (E6AP)), фермента, кодированного геном UBE3A, и использованию кассеты экспрессии для достижения терапевтических уровней UBE3A/E6AP у субъекта.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к полинуклеотиду, содержащему открытую рамку считывания UBE3A млекопитающего. Открытой рамкой считывания является часть гена UBE3A, которая кодирует UBE3A/E6AP. В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может

быть открытой рамкой считывания UBE3A человека. Открытая рамка считывания UBE3A человека может кодировать одну или несколько изоформ UBE3A человека в одной и той же рамке считывания. Например, в некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может быть открытой рамкой считывания короткой изоформы UBE3A человека (*т.е.* изоформы 1 UBE3A человека) и/или длинной изоформы UBE3A человека (*например*, изоформы 2 и/или 3 UBE3A человека). В некоторых вариантах осуществления, открытой рамкой считывания UBE3A млекопитающего может являться открытая рамка считывания изоформы 1 и изоформы 3 UBE3A человека. В других вариантах осуществления, открытой рамкой считывания UBE3A млекопитающего может являться открытая рамка считывания изоформы 1 и изоформы 2 UBE3A человека. В настоящем контексте, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует UBE3A/Е6АР млекопитающего, *например*, открытая рамка считывания UBE3A человека относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует UBE3A/Е6АР человека. Там, где это целесообразно для функции, поскольку термин открытая рамка считывания UBE3A используется в настоящем документе для обозначения открытой рамки считывания, которая кодирует как короткую изоформу UBE3A человека, так и длинную изоформу UBE3A человека, открытая рамка считывания включает 5' расположенные выше последовательности нуклеиновых кислот, которые охватывают последовательность Козака, которая влияет на экспрессию длинной изоформы. Такая открытая рамка считывания показана на **ФИГ. 13** и **ФИГ. 14**.

SEQ ID NO: 1. Короткая изоформа UBE3A дикого типа человека (изоформа 1; номер доступа GenBank NM_130838.3)

```
GCTGCCTGCCGGGATACTCGGCCCCGCCAGCCAGTCCTCCCGTCTTGCGCCGC
GGCCGCGAGATCCGTGTGTCTCCCAAGATGGTGGCGCTGGGCTCGGGGTGACTACA
GGAGACGACGGGGCCTTTTCCCTTCGCCAGGACCCGACACACCAGGCTTCGCTCGCT
CGCGCACCCCTCCGCCGCGTAGCCATCCGCCAGCGCGGGCGCCCGCCATCCGCCGCC
TACTTACGCTTCACCTCTGCCGACCCGGCGCGCTCGGCTGCGGGCGGCGGCGCCTCC
TTCGGCTCCTCCTCGGAATAGCTCGCGGCCTGTAGCCCCTGGCAGGAGGGCCCCCTCA
GCCCCCGGTGTGGACAGGCAGCGGCGGCTGGCGACGAACGCCGGGATTTTCGGCGG
CCCCGGCGCTCCCTTTCCCGGCCTCGTTTTTCCGGATAAGGAAGCGCGGGTCCCGCAT
GAGCCCCGGCGGTGGCGGCAGCGAAAGAGAACGAGGCGGTGGCGGGCGGAGGCGG
CGGGCGAGGGCGACTACGACCAGTGAGGCGGCCGCCAGCCAGGCGCGGGGGC
GACGACAGATCAGGAGAACCTCAGTCTGACGACATTGAAGCTAGCCGAATGAAGCG
AGCAGCTGCAAAGCATCTAATAGAACGCTACTACCACCAGTTAACTGAGGGCTGTG
GAAATGAAGCCTGCACGAATGAGTTTTGTGCTTCCTGTCCAACCTTTTCTTCGTATGG
ATAATAATGCAGCAGCTATTAAAGCCCTCGAGCTTTATAAGATTAATGCAAACTCT
GTGATCCTCATCCCTCCAAGAAAGGAGCAAGCTCAGCTTACCTTGAGAACTCGAAA
GGTGCCCCCAACAACCTCTGCTCTGAGATAAAAATGAACAAGAAAGGCGCTAGAAT
TGATTTTAAAGATGTGACTTACTTAACAGAAGAGAAGGTATATGAAATTCTTGAATT
```

ATGTAGAGAAAGAGAGGATTATTCCCCTTTAATCCGTGTTATTGGAAGAGTTTTTTC
 TAGTGCTGAGGCATTGGTACAGAGCTTCCGGAAAGTTAAACAACACACCAAGGAAG
 AACTGAAATCTCTTCAAGCAAAAGATGAAGACAAAGATGAAGATGAAAAGGAAAA
 AGCTGCATGTTCTGCTGCTGCTATGGAAGAAGACTCAGAAGCATCTTCCTCAAGGAT
 AGGTGATAGCTCACAGGGAGACAACAATTTGCAAAAATTAGGCCCTGATGATGTGT
 CTGTGGATATTGATGCCATTAGAAGGGTCTACACCAGATTGCTCTCTAATGAAAAAA
 TTGAAACTGCCTTTCTCAATGCACTTGTATATTTGTACCTAACGTGGAATGTGACTT
 GACGTATCACAATGTATACTCTCGAGATCCTAATTATCTGAATTTGTTTCATTATCGTA
 ATGGAGAATAGAAATCTCCACAGTCCTGAATATCTGGAAATGGCTTTGCCATTATTT
 TGCAAAGCGATGAGCAAGCTACCCCTTGACAGCCCAAGGAAAACTGATCAGACTGTG
 GTCTAAATACAATGCAGACCAGATTCGGAGAATGATGGAGACATTTTCAGCAACTTA
 TTAATTATAAAGTCATAAGCAATGAATTTAACAGTCGAAATCTAGTGAATGATGATG
 ATGCCATTGTTGCTGCTTCGAAGTGCTTGAAAATGGTTTACTATGCAAATGTAGTGG
 GAGGGGAAGTGGACACAAATCACAATGAAGAAGATGATGAAGAGCCCATCCCTGA
 GTCCAGCGAGCTGACACTTCAGGAACCTTTTGGGAGAAGAAAGAAGAAACAAGAAA
 GGTCCCTCGAGTGGACCCCCTGGAAACTGAACTTGGTGTTAAAACCCTGGATTGTCGA
 AAACCACTTATCCCTTTTGAAGAGTTTATTAATGAACCACTGAATGAGGTTCTAGAA
 ATGGATAAAGATTATACTTTTTTCAAAGTAGAAACAGAGAACAAATTCTCTTTTATG
 ACATGTCCCTTTATATTGAATGCTGTACAAAGAATTTGGGATTATATTATGACAAT
 AGAATTCGCATGTACAGTGAACGAAGAATCACTGTTCTCTACAGCTTAGTTCAAGGA
 CAGCAGTTGAATCCATATTTGAGACTCAAAGTTAGACGTGACCATATCATAGATGAT
 GCACTTGTCCGGCTAGAGATGATCGCTATGGAAAATCCTGCAGACTTGAAGAAGCA
 GTTGATATGTGGAATTTGAAGGAGAACAAGGAGTTGATGAGGGAGGTGTTTCCAAAG
 AATTTTTTTCAGCTGGTTGTGGAGGAAATCTTCAATCCAGATATTGGTATGTTACAT
 ACGATGAATCTACAAAATTGTTTTTGGTTTAATCCATCTTCTTTTGAAACTGAGGGTCA
 GTTTACTCTGATTGGCATAGTACTGGGTCTGGCTATTTACAATAACTGTATACTGGAT
 GTACATTTTCCCATGGTTGTCTACAGGAAGCTAATGGGGAAAAAAGGAACTTTTCGT
 GACTTGGGAGACTCTCACCCAGTTCTATATCAGAGTTTAAAAGATTTATTGGAGTAT
 GAAGGGAATGTGGAAGATGACATGATGATCACTTTCCAGATATCACAGACAGATCT
 TTTTGGTAACCCAATGATGTATGATCTAAAGGAAAATGGTGATAAAATTCCAATTAC
 AAATGAAAACAGGAAGGAATTTGTCAATCTTTATTCTGACTACATTCTCAATAAATC
 AGTAGAAAAACAGTTCAAGGCTTTTCGGAGAGGTTTTTCATATGGTGACCAATGAATC
 TCCCTTAAAGTACTTATTCAGACCAGAAGAAATTGAATTGCTTATATGTGGAAGCCG
 GAATCTAGATTTCCAAGCACTAGAAGAACTACAGAATATGACGGTGGCTATACCA
 GGGACTCTGTTCTGATTAGGGAGTTCTGGGAAATCGTTCATTTCATTACAGATGAAC
 AGAAAAGACTCTTCTTGCAGTTTACAACGGGCACAGACAGAGCACCTGTGGGAGGA
 CTAGGAAAATTAAAGATGATTATAGCCAAAAATGGCCCAGACACAGAAAGGTTACC
 TACATCTCATACTTGCTTTAATGTGCTTTTACTTCCGGAATACTCAAGCAAAGAAAA
 ACTTAAAGAGAGATTGTTGAAGGCCATCACGTATGCCAAAGGATTTGGCATGCTGT
 AAAACAAAACAAAACAAAATAAAAACAAAAAAAAGGAAGGAAAAAAAAGAAAAA

ATTTAAAAAATTTTAAAAATATAACGAGGGATAAATTTTTGGTGGTGATAGTGTCCC
 AGTACAAAAAGGCTGTAAGATAGTCAACCACAGTAGTCACCTATGTCTGTGCCTCCC
 TTCTTTATTGGGGACATGTGGGCTGGAACAGCAGATTTTCAGCTACATATATGAACAA
 ATCCTTTATTATTATTATAATTATTTTTTTGCGTGAAAGTGTTACATATTCTTTCACTT
 GTATGTACAGAGAGGTTTTTCTGAATATTTATTTTAAGGGTTAAATCACTTTTGCTTG
 TGTTTATTACTGCTTGAGGTTGAGCCTTTTGAGTATTTAAAAAATATATACCAACAG
 AACTACTCTCCCAAGGAAAATATTGCCACCATTTGTAGACCACGTAACCTTCAAGTA
 TGTGCTACTTTTTTGCCCTGTATCTAACTCAAATCAGGAACTGTATTTTTTTTAATG
 ATTTGCTTTTGAACTTGAAAGTCTGAAAACAGTGTGATGCAATTACTGCTGTTCTA
 GCCCCAAAGAGTTTTCTGTGCAAAATCTTGAGAATCAATCAATAAAGAAAGATGG
 AAGGAAGGGAGAAATTGGAATGTTTTAACTGCAGCCCTCAGAACTTTAGTAACAGC
 ACAACAAATTA AAAACA AAAACA AACTCATGCCACAGTATGTCGTCTTCATGTGTCTT
 GCAATGAACTGTTTCAGTAGCCAATCCTCTTTCTTAGTATATGAAAGGACAGGGATT
 TTTGTTCTTGTTGTTCTCGTTGTTGTTTTAAGTTTACTGGGGAAAGTGCATTTGGCCA
 AATGAAATGGTAGTCAAGCCTATTGCAACAAAGTTAGGAAGTTTGTTGTTTGTTTAT
 TATAAACAAAAAGCATGTGAAAGTGCACTTAAGATAGAGTTTTTTATTAATTACTTAC
 TTATTACCTAGATTTTAAATAGACAATCCAAAGTCTCCCCTTCGTGTTGCCATCATCT
 TGTTGAATCAGCCATTTTATCGAGGCACGTGATCAGTGTTGCAACATAATGAAAAAG
 ATGGCTACTGTGCCTTGTTGTTACTTAATCATACAGTAAGCTGACCTGGAAATGAATG
 AAATATTACTCCTAAGAATTACATTGTATAGCCCCACAGATTAAATTTAATTAATT
 AATTCAAAACATGTTAAACGTTACTTTTCATGTACTATGGAAAAGTACAAGTAGGTTT
 ACATTACTGATTTCCAGAAGTAAGTAGTTTCCCCTTTCCTAGTCTTCTGTGTATGTGA
 TGTTGTTAATTTCTTTTATTGCATTATAAAATAAAAGGATTATGTATTTTAACTAAG
 GTGAGACATTGATATATCCTTTTGCTACAAGCTATAGCTAATGTGCTGAGCTTGTC
 CTTGGTGATTGATTGATTGATTGACTGATTGTTTTAACTGATTACTGTAGATCAACCT
 GATGATTTGTTTGTTTGAAATTGGCAGGAAAAATGCAGCTTTCAAATCATTGGGGGG
 AGAAAAAGGATGTCTTTCAGGATTATTTTAATTAATTTTTTTTCATAATTGAGACAGA
 ACTGTTTGTTATGTACCATAATGCTAAATAAACTGTGGCACTTTTCACCATAATTTA
 ATTTAGTGGA AAAAGAAGACAATGCTTTCCATATTGTGATAAGGTAACATGGGGTTT
 TTCTGGGCCAGCCTTTAGAACACTGTTAGGGTACATACGCTACCTTGATGAAAGGGA
 CCTTCGTGCAACTGTAGTCATCTTAAAGGCTTCTCATCCACTGTGCTTCTTAATGTGT
 AATTAAAGTGAGGAGAAATTAAATACTCTGAGGGCGTTTTATATAATAAATTCGTGA
 AGAAATGTGTGCTCTTCA

SEQ ID NO: 2. Длинная изоформа UBE3A дикого типа человека (изоформа 2; номер доступа GenBank NM_000462.5)

GCTGCCTGCCGGGATACTCGGCCCCGCCAGCCAGTCCTCCCGTCTTGCGCCGC
 GGCCGCGAGATCCGTGTGTCTCCCAAGATGGTGGCGCTGGGCTCGGGGTGACTACA
 GGAGACGACGGGGCCTTTTCCCTTCGCCAGGACCCGACACACCAGGCTTCGCTCGCT
 CGCGCACCCCTCCGCCGCGTAGCCATCCGCCAGCGCGGGCGCCCGCCATCCGCCGCC
 TACTTACGCTTCACCTCTGCCGACCCGGCGCGCTCGGCTGCGGGCGGCGGCGCCTCC

TTCGGCTCCTCCTCGGAATAGCTCGCGGCCTGTAGCCCCTGGCAGGAGGGCCCCCTCA
GCCCCCGGTGTGGACAGGCAGCGGCGGCTGGCGACGAACGCCGGGATTTTCGGCGG
CCCCGGCGCTCCCTTTCCCGGCCTCGTTTTCCGGATAAGGAAGCGCGGGTCCCGCAT
GAGCCCCGGCGGTGGCGGCAGCGAAAGAGAACGAGGCGGTGGCGGGCGGAGGCGG
CGGGCGAGGGCGACTACGACCAGTGAGGCGGCCGCCGAGCCCAGGCGCGGGGGC
GACGACAGGTTAAAAATCTGTAAGAGCCTGATTTTAGAATTCACCAGCTCCTCAGAA
GTTTGGCGAAATATGAGTTATTAAGCCTACGCTCAGATCAAGGTAGCAGCTAGACTG
GTGTGACAACCTGTTTTTAATCAGTGACTCAAAGCTGTGATCACCTGATGTCACCG
AATGGCCACAGCTTGTAAGAGAGAGTTACAGTGAGGTAAGGAGTGGCTTGACAG
GATGGAGAAGCTGCACCAGTGTTATTGGAAATCAGGAGAACCTCAGTCTGACGACA
TTGAAGCTAGCCGAATGAAGCGAGCAGCTGCAAAGCATCTAATAGAACGCTACTAC
CACCAGTTAACTGAGGGCTGTGGAAATGAAGCCTGCACGAATGAGTTTTGTGCTTCC
TGTCCTAACTTTTCTTCGTATGGATAATAATGCAGCAGCTATTAAAGCCCTCGAGCTTT
ATAAGATTAATGCAAACTCTGTGATCCTCATCCCTCCAAGAAAGGAGCAAGCTCA
GCTTACCTTGAGAACTCGAAAGGTGCCCCCAACAACCTCCTGCTCTGAGATAAAAATG
AACAAGAAAGGCGCTAGAATTGATTTTAAAGATGTGACTTACTTAACAGAAGAGAA
GGTATATGAAATTCTTGAATTATGTAGAGAAAGAGAGGATTATTCCCCTTTAATCCG
TGTTATTGGAAGAGTTTTTTCTAGTGCTGAGGCATTGGTACAGAGCTTCCGGAAAGT
TAAACAACACACCAAGGAAGAACTGAAATCTCTTCAAGCAAAAGATGAAGACAAA
GATGAAGATGAAAAGGAAAAAGCTGCATGTTCTGCTGCTGCTATGGAAGAAGACTC
AGAAGCATCTTCCTCAAGGATAGGTGATAGCTCACAGGGAGACAACAATTTGCAAA
AATTAGGCCCTGATGATGTGTCTGTGGATATTGATGCCATTAGAAGGGTCTACACCA
GATTGCTCTCTAATGAAAAAATTGAACTGCCTTTTCTCAATGCACTTGTATATTTGTC
ACCTAACGTGGAATGTGACTTGACGTATCACAATGTATACTCTCGAGATCCTAATTA
TCTGAATTTGTTTCATTATCGTAATGGAGAATAGAAATCTCCACAGTCCTGAATATCT
GGAAATGGCTTTGCCATTATTTTGCAAAGCGATGAGCAAGCTACCCCTTGACAGCCCA
AGGAAAACCTGATCAGACTGTGGTCTAAATACAATGCAGACCAGATTCGGAGAATGA
TGGAGACATTTAGCAACTTATTACTTATAAAGTCATAAGCAATGAATTTAACAGTC
GAAATCTAGTGAATGATGATGATGCCATTGTTGCTGCTTCGAAGTGCTTGAAAATGG
TTTACTATGCAAATGTAGTGGGAGGGGAAGTGGACACAAATCACAATGAAGAAGAT
GATGAAGAGCCCATCCCTGAGTCCAGCGAGCTGACACTTCAGGAACCTTTTGGGAGA
AGAAAGAAGAAACAAGAAAGGTCCTCGAGTGGACCCCCTGGAACTGAACTTGGTG
TTAAAACCCTGGATTGTGCGAAAACCACTTATCCCTTTTGAAGAGTTTATTAATGAAC
CACTGAATGAGGTTCTAGAAATGGATAAAGATTATACTTTTTTCAAAGTAGAAACAG
AGAACAAATTCTCTTTTATGACATGTCCCTTTATATTGAATGCTGTCACAAAGAATTT
GGGATTATATTATGACAATAGAATTCGCATGTACAGTGAACGAAGAATCACTGTTCT
CTACAGCTTAGTTCAAGGACAGCAGTTGAATCCATATTTGAGACTCAAAGTTAGACG
TGACCATATCATAGATGATGCACTTGTCCGGCTAGAGATGATCGCTATGGAAAATCC
TGCAGACTTGAAGAAGCAGTTGTATGTGGAATTTGAAGGAGAACAAGGAGTTGATG
AGGGAGGTGTTTCCAAAGAATTTTTTCAGCTGGTTGTGGAGGAAATCTTCAATCCAG

ATATTGGTATGTTACATACGATGAATCTACAAAATTGTTTTGGTTTAATCCATCTTC
TTTTGAAACTGAGGGTCAGTTTACTCTGATTGGCATAGTACTGGGTCTGGCTATTTAC
AATAACTGTATACTGGATGTACATTTTCCCATGGTTGTCTACAGGAAGCTAATGGGG
AAAAAAGGAACTTTTCGTGACTTGGGAGACTCTCACCCAGTTCTATATCAGAGTTTA
AAAGATTTATTGGAGTATGAAGGGAATGTGGAAGATGACATGATGATCACTTTCCA
GATATCACAGACAGATCTTTTTGGTAACCCAATGATGTATGATCTAAAGGAAAATGG
TGATAAAATTCCAATTACAAATGAAAACAGGAAGGAATTTGTCAATCTTTATTCTGA
CTACATTCTCAATAAATCAGTAGAAAAACAGTTCAAGGCTTTTCGGAGAGGTTTTCA
TATGGTGACCAATGAATCTCCCTTAAAGTACTTATTCAGACCAGAAGAAATTGAATT
GCTTATATGTGGAAGCCGGAATCTAGATTTCCAAGCACTAGAAGAACTACAGAAT
ATGACGGTGGCTATACCAGGGACTCTGTTCTGATTAGGGAGTTCTGGGAAATCGTTC
ATTCATTTACAGATGAACAGAAAAGACTCTTCTTGCAGTTTACAACGGGGCACAGACA
GAGCACCTGTGGGAGGACTAGGAAAATTAAGATGATTATAGCCAAAAATGGCCCA
GACACAGAAAGGTTACCTACATCTCATACTTGCTTTAATGTGCTTTTACTTCCGGAAT
ACTCAAGCAAAGAAAAAACTTAAAGAGAGATTGTTGAAGGCCATCACGTATGCCAAA
GGATTTGGCATGCTGTAAAACAAAACAAAACAAAATAAAACAAAAAAAAGGAAGG
AAAAAAAAGAAAAAATTTAAAAAATTTTAAAAATATAACGAGGGATAAATTTTTG
GTGGTGATAGTGTCCCAGTACAAAAAGGCTGTAAGATAGTCAACCACAGTAGTCAC
CTATGTCTGTGCCTCCCTTCTTTATTGGGGACATGTGGGCTGGAACAGCAGATTTCA
GCTACATATATGAACAAATCCTTTATTATTATTATAATTATTTTTTTGCGTGAAAGTG
TTACATATTCTTTCACTTGTATGTACAGAGAGGTTTTTCTGAATATTTATTTTAAGGG
TTAAATCACTTTTGCTTGTGTTTATTACTGCTTGAGGTTGAGCCTTTTGAGTATTTAA
AAAATATATACCAACAGAACTACTCTCCCAAGGAAAATATTGCCACCATTTGTAGAC
CACGTAACCTTCAAGTATGTGCTACTTTTTTTGTCCCTGTATCTAACTCAAATCAGGAA
CTGTATTTTTTTTAATGATTTGCTTTTGAACTTGAAGTCTTGAAAACAGTGTGATGC
AATTACTGCTGTTCTAGCCCCCAAAGAGTTTTCTGTGCAAAATCTTGAGAATCAATC
AATAAAGAAAGATGGAAGGAAGGGAGAAATTGGAATGTTTTAACTGCAGCCCTCAG
AACTTTAGTAACAGCACAAACAATTA AAAACAAAACAACTCATGCCACAGTATGT
CGTCTTCATGTGTCTTGCAATGAACTGTTTCAGTAGCCAATCCTCTTTCTTAGTATAT
GAAAGGACAGGGATTTTTGTTCTTGTTGTTCTCGTTGTTGTTTTAAGTTTACTGGGGA
AAGTGCATTTGGCCAAATGAAATGGTAGTCAAGCCTATTGCAACAAAGTTAGGAAG
TTTGTTGTTTGTTTATTATAAACAAAAAGCATGTGAAAGTGCACTTAAGATAGAGTT
TTTATTAATTACTTACTTATTACCTAGATTTTAAATAGACAATCCAAAGTCTCCCCTT
CGTGTTGCCATCATCTTGTTGAATCAGCCATTTTATCGAGGCACGTGATCAGTGTTGC
AACATAATGAAAAAGATGGCTACTGTGCCTTGTTGTTACTTAATCATACAGTAAGCTG
ACCTGGAAATGAATGAACTATTACTCCTAAGAATTACATTGTATAGCCCCACAGAT
TAAATTTAATTAATTAATTCAAAACATGTTAAACGTTACTTTTCATGTACTATGGAAA
AGTACAAGTAGGTTTACATTACTGATTTCCAGAAGTAAGTAGTTTCCCCTTTCCTAGT
CTTCTGTGTATGTGATGTTGTTAATTTCTTTTATTGCATTATAAAATAAAAGGATTAT
GTATTTTTAACTAAGGTGAGACATTGATATATCCTTTTGCTACAAGCTATAGCTAAT

GTGCTGAGCTTGTGCCTTGGTGATTGATTGATTGATTGACTGATTGTTTTAACTGATT
 ACTGTAGATCAACCTGATGATTTGTTTGTGTTGAAATTGGCAGGAAAAATGCAGCTTT
 CAAATCATTGGGGGGGAGAAAAAGGATGTCTTTCAGGATTATTTTAATTAATTTTTTT
 CATAATTGAGACAGAACTGTTTGTATGTACCATAATGCTAAATAAACTGTGGCAC
 TTTTCACCATAATTTAATTTAGTGGAAGAAAGACAATGCTTTCCATATTGTGATA
 AGGTAACATGGGGTTTTTCTGGGCCAGCCTTTAGAACACTGTTAGGGTACATACGCT
 ACCTTGATGAAAGGGACCTTCGTGCAACTGTAGTCATCTTAAAGGCTTCTCATCCAC
 TGTGCTTCTTAATGTGTAATTAAGTGAGGAGAAATTAATACTCTGAGGGCGTTTT
 ATATAATAAATTCGTGAAGAAATGTGTGCTCTTCA

SEQ ID NO: 3. Длинная изоформа UBE3A дикого типа человека (изоформа 3; номер доступа GenBank NM_130839.4)

GCTGCCTGCCGGGATACTCGGCCCCGCCAGCCAGTCCTCCCGTCTTGCGCCGC
 GGCCGCGAGATCCGTGTGTCTCCCAAGATGGTGCGCTGGGCTCGGGGTGACTACA
 GGAGACGACGGGGCCTTTTCCCTTCGCCAGGACCCGACACACCAGGCTTCGCTCGCT
 CGCGCACCCCTCCGCCGCGTAGCCATCCGCCAGCGCGGGCGCCCGCCATCCGCCGCC
 TACTTACGCTTCACCTCTGCCGACCCGGCGCGCTCGGCTGCGGGCGGCGGGCGCCTCC
 TTCGGCTCCTCCTCGGAATAGCTCGCGGCCTGTAGCCCCTGGCAGGAGGGCCCCCTCA
 GCCCCCGGTGTGGACAGGCAGCGGCGGCTGGCGACGAACGCCGGGATTTTCGGCGG
 CCCC GGCGCTCCCTTTCCCGGCCTCGTTTTTCCGGATAAGGAAGCGCGGGTCCCGCAT
 GAGCCCCGGCGGTGGCGGCAGCGAAAGAGAACGAGGCGGTGGCGGGCGGAGGCGG
 CGGGCGAGGGCGACTACGACCAGTGAGGCGGCCGCCGAGCCCAGGCGCGGGGGC
 GACGACAGGTAAAAATCTGTAAGAGCCTGATTTTAGAATTCACCAGCTCCTCAGAA
 GTTTGGCGAAATATGAGTTATTAAGCCTACGCTCAGATCAAGGTAGCAGCTAGACTG
 GTGTGACAACCTGTTTTTAATCAGTGACTCAAAGCTGTGATCACCTGATGTCACCG
 AATGGCCACAGCTTGTAAGAGATCAGGAGAACCTCAGTCTGACGACATTGAAGCTA
 GCCGAATGAAGCGAGCAGCTGCAAAGCATCTAATAGAACGCTACTACCACCAGTTA
 ACTGAGGGCTGTGGAATGAAGCCTGCACGAATGAGTTTTGTGCTTCTGTCCAAC
 TTTCTTCGTATGGATAATAATGCAGCAGCTATTAAAGCCCTCGAGCTTTATAAGATT
 AATGCAAACTCTGTGATCCTCATCCCTCCAAGAAAGGAGCAAGCTCAGCTTACCTT
 GAGAACTCGAAAGGTGCCCCCAACAACCTCCTGCTCTGAGATAAAAATGAACAAGAA
 AGGCGCTAGAATTGATTTTAAAGATGTGACTTACTTAACAGAAGAGAAGGTATATG
 AAATTCTTGAATTATGTAGAGAAAGAGAGGATTATTCCCCTTTAATCCGTGTTATTG
 GAAGAGTTTTTTCTAGTGCTGAGGCATTGGTACAGAGCTTCCGGAAAGTTAAACAAC
 ACACCAAGGAAGAACTGAAATCTCTTCAAGCAAAAGATGAAGACAAAGATGAAGA
 TGAAAAGGAAAAAGCTGCATGTTCTGCTGCTGCTATGGAAGAAGACTCAGAAGCAT
 CTCCTCAAGGATAGGTGATAGCTCACAGGGAGACAACAATTTGCAAAAATTAGGC
 CCTGATGATGTGTCTGTGGATATTGATGCCATTAGAAGGGTCTACACCAGATTGCTC
 TCTAATGAAAAAATTGAAACTGCCTTTCTCAATGCACTTGTATATTTGTCACCTAAC
 GTGGAATGTGACTTGACGTATCACAATGTATACTCTCGAGATCCTAATTATCTGAAT
 TTGTTCAATTATCGTAATGGAGAATAGAAATCTCCACAGTCCTGAATATCTGGAAATG

GCTTTGCCATTATTTTGCAAAGCGATGAGCAAGCTACCCCTTGCAGCCCAAGGAAAA
CTGATCAGACTGTGGTCTAAATACAATGCAGACCAGATTCGGAGAATGATGGAGAC
ATTTTCAGCAACTTATTACTTATAAAGTCATAAGCAATGAATTTAACAGTCGAAATCT
AGTGAATGATGATGATGCCATTGTTGCTGCTTCGAAGTGCTTGAAAATGGTTTACTA
TGCAAATGTAGTGGGAGGGGAAGTGGACACAAATCACAATGAAGAAGATGATGAA
GAGCCCATCCCTGAGTCCAGCGAGCTGACACTTCAGGAACTTTTGGGAGAAGAAAG
AAGAAACAAGAAAGGTCCTCGAGTGGACCCCTGGAACTGAAGTTGGTGTAAAAA
CCCTGGATTGTCGAAAACCACTTATCCCTTTTGAAGAGTTTATTAATGAACCACTGA
ATGAGGTTCTAGAAATGGATAAAGATTATACTTTTTTCAAAGTAGAAACAGAGAAC
AAATTCTCTTTTATGACATGTCCCTTTATATTGAATGCTGTCACAAAGAATTTGGGAT
TATATTATGACAATAGAATTCGCATGTACAGTGAACGAAGAATCACTGTTCTCTACA
GCTTAGTTCAAGGACAGCAGTTGAATCCATATTTGAGACTCAAAGTTAGACGTGACC
ATATCATAGATGATGCACTTGTCCGGCTAGAGATGATCGCTATGGAAAATCCTGCAG
ACTTGAAGAAGCAGTTGTATGTGGAATTTGAAGGAGAACAAGGAGTTGATGAGGGA
GGTGTTCCTCAAAGAATTTTTTCAGCTGGTTGTGGAGGAAATCTTCAATCCAGATATT
GGTATGTTACATACGATGAATCTACAAAATTGTTTTGGTTTAATCCATCTTCTTTTG
AACTGAGGGTCAGTTTACTCTGATTGGCATAGTACTGGGTCTGGCTATTTACAATA
ACTGTATACTGGATGTACATTTTCCCATGGTTGTCTACAGGAAGCTAATGGGGAAAA
AAGGAAGTTTTCGTGACTTGGGAGACTCTCACCCAGTTCTATATCAGAGTTTAAAAG
ATTTATTGGAGTATGAAGGGAATGTGGAAGATGACATGATGATCACTTTCCAGATAT
CACAGACAGATCTTTTTGGTAACCCAATGATGTATGATCTAAAGGAAAATGGTGATA
AAATTCCAATTACAAATGAAAACAGGAAGGAATTTGTCAATCTTTATTCTGACTACA
TTCTCAATAAATCAGTAGAAAAACAGTTCAAGGCTTTTCGGAGAGGTTTTTCATATGG
TGACCAATGAATCTCCCTTAAAGTACTTATTCAGACCAGAAGAAATTGAATTGCTTA
TATGTGGAAGCCGGAATCTAGATTTCCAAGCACTAGAAGAAACTACAGAATATGAC
GGTGGCTATACCAGGGACTCTGTTCTGATTAGGGAGTTCTGGGAAATCGTTCATTCA
TTTACAGATGAACAGAAAAGACTCTTCTTGCAGTTTACAACGGGCACAGACAGAGC
ACCTGTGGGAGGACTAGGAAAATTAAAGATGATTATAGCCAAAAATGGCCCAGACA
CAGAAAGGTTACCTACATCTCATACTTGCTTTAATGTGCTTTTACTTCCGGAATACTC
AAGCAAAGAAAAACTTAAAGAGAGATTGTTGAAGGCCATCACGTATGCCAAAGGAT
TTGGCATGCTGTAAAACAAAACAAAACAAAATAAAAACAAAAAAAAGGAAGGAAAA
AAAAAGAAAAAATTTAAAAAATTTTAAAAATATAACGAGGGATAAATTTTTGGTGG
TGATAGTGTCCCAGTACAAAAAGGCTGTAAGATAGTCAACCACAGTAGTCACCTAT
GTCTGTGCCTCCCTTCTTTATTGGGGACATGTGGGCTGGAACAGCAGATTTTCAGCTA
CATATATGAACAAATCCTTTATTATTATTATAATTATTTTTTTGCGTGAAAGTGTTAC
ATATTCTTTCACTTGTATGTACAGAGAGGTTTTTCTGAATATTTATTTTAAGGGTTAA
ATCACTTTTGCTTGTGTTTATTACTGCTTGAGGTTGAGCCTTTTGAGTATTTAAAAAA
TATATACCAACAGAACTACTCTCCCAAGGAAAATATTGCCACCATTTGTAGACCACG
TAACCTTCAAGTATGTGCTACTTTTTTGTCCCTGTATCTAACTCAAATCAGGAACTGT
ATTTTTTTTAATGATTTGCTTTTGAACTTGAAGTCTTGAAAACAGTGTGATGCAATT

ACTGCTGTTCTAGCCCCCAAAGAGTTTTCTGTGCAAAATCTTGAGAATCAATCAATA
AAGAAAGATGGAAGGAAGGGAGAAATTGGAATGTTTTAACTGCAGCCCTCAGAACT
TTAGTAACAGCACAAACAAATTA AAAAACA AAAAACA AACTCATGCCACAGTATGTCGTC
TTCATGTGTCTTGCAATGAACTGTTTCAGTAGCCAATCCTCTTTCTTAGTATATGAAA
GGACAGGGATTTTTGTTCTTGTTGTTCTCGTTGTTGTTTTAAGTTTACTGGGGAAAGT
GCATTTGGCCAAATGAAATGGTAGTCAAGCCTATTGCAACAAAGTTAGGAAGTTTGT
TGTTTGTTTATTATAAACA AAAAAGCATGTGAAAGTGCACCTTAAGATAGAGTTTTTAT
TAATTACTTACTTATTACCTAGATTTTAAATAGACAATCCAAAGTCTCCCCCTTCGTGT
TGCCATCATCTTGTTGAATCAGCCATTTTATCGAGGCACGTGATCAGTGTTGCAACA
TAATGAAAAAGATGGCTACTGTGCCTTGTTGTTACTTAATCATACAGTAAGCTGACCT
GGAAATGAATGAAACTATTACTCCTAAGAATTACATTGTATAGCCCCACAGATTAAA
TTTAATTAATTAATTCAAAACATGTAAACGTTACTTTTCATGTACTATGGAAAAGTA
CAAGTAGGTTTACATTACTGATTTCCAGAAGTAAGTAGTTTCCCCTTTCCTAGTCTTC
TGTGTATGTGATGTTGTTAATTTCTTTTATTGCATTATAAAATAAAAGGATTATGTAT
TTTTAACTAAGGTGAGACATTGATATATCCTTTTGCTACAAGCTATAGCTAATGTGCT
GAGCTTGTGCCTTGGTGATTGATTGATTGATTGACTGATTGTTTTAACTGATTACTGT
AGATCAACCTGATGATTTGTTTGTTTGAAATTGGCAGGAAAAATGCAGCTTTCAAAT
CATTGGGGGGAGAAAAAGGATGTCTTTCAGGATTATTTTAATTAATTTTTTTCATAA
TTGAGACAGAACTGTTTGTTATGTACCATAATGCTAAATAAAACTGTGGCACTTTTC
ACCATAATTTAATTTAGTGGAAAAAGAAGACAATGCTTTCCATATTGTGATAAGGTA
ACATGGGGTTTTTCTGGGCCAGCCTTTAGAACACTGTTAGGGTACATACGCTACCTT
GATGAAAGGGACCTTCGTGCAACTGTAGTCATCTTAAAGGCTTCTCATCCACTGTGC
TTCTTAATGTGTAATTAAAGTGAGGAGAAATTAAATACTCTGAGGGCGTTTTATATA
ATAAATTCGTGAAGAAATGTGTGCTCTTCA

Не желая связываться с теорией, анализ экспрессии изоформы UBE3A в ткани мозга человека показал, что короткая изоформа 1 UBE3A экспрессируется в соотношении от 4:1 до 8:1 по сравнению с длинными изоформами UBE3A, в зависимости от конкретной исследуемой области мозга (Mele et al, Science, 2015; 348(6235):660-665). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может содержать одну или несколько последовательностей Козака, которые модифицированы из WT или контроля, *например*, содержит, состоит по существу из или состоит из полинуклеотидной последовательности, в которой 1, 2, 3, 4, 5 или несколько нуклеотидов были заменены, добавлены и/или удалены по сравнению с WT или контролем, *например*, консенсусной последовательностью Козака и/или последовательностью Козака UBE3A дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может содержать одну или несколько последовательностей Козака, содержащих нуклеотидные модификации (*например*, замены), которые снижают и/или усиливают иницирующую активность одного или нескольких старт-кодонов (*т. е.* одного или нескольких иницирующих кодонов, также известных как сайты начала трансляции) в открытой рамке считывания. В

некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может содержать одну или несколько последовательностей Козака, содержащих нуклеотидные модификации (*например*, замены), которые снижают активность инициации одного или нескольких старт-кодонов (*например*, снижают экспрессию изоформы) на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с контролем, *например*, консенсусной последовательностью Козака или, *например*, последовательностью Козака UBE3A дикого типа (*например*, не модифицированную). В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может содержать одну или несколько последовательностей Козака, содержащих нуклеотидные модификации (*например*, замены), которые усиливают активность инициации одного или нескольких старт-кодонов (*например*, усиливают экспрессию изоформы) на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 150%, 200% или более по сравнению с контролем, *например*, консенсусной последовательностью Козака или, *например*, последовательностью Козака UBE3A дикого типа (*например*, не модифицированной). В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего может содержать одну или несколько нуклеотидных модификаций для обеспечения экспрессии короткой изоформы в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы, *например*, соотношение примерно 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1 или 15:1 или любое их значение или диапазон. Например, в некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего (*например*, человека) может содержать одну или несколько нуклеотидных модификаций для обеспечения экспрессии короткой изоформы в соотношении от примерно 2:1 до примерно 4,5:1, от примерно 1:1 до примерно 10:1, от примерно 3:1 до примерно 8,5:1 или от примерно 3:1 до примерно 4:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы. Например, в некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего (*например*, человека) может содержать одну или несколько нуклеотидных модификаций для обеспечения экспрессии короткой изоформы в соотношении примерно 2,5:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 6,5:1, примерно 8:1 или примерно 10:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего содержит первую последовательность Козака, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6 или последовательности на, по меньшей мере, примерно 50% идентичной ей, *например*, по меньшей мере, примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей. В некоторых вариантах осуществления, первая последовательность Козака (*например*, SEQ ID NO: 6) функционально связана с изоформой 3 или изоформой 2, *например*, путем замены или модификации последовательности Козака изоформы 3 WT или изоформы 2 WT (SEQ ID NO: 5 или 4 соответственно).

SEQ ID NO: 4. Последовательность Козака длинной изоформы 2 UBE3A дикого типа человека (старт-кодон подчеркнут).

UGCAGGAAUGG

SEQ ID NO: 5. Последовательность Козака длинной изоформы 3 UBE3A дикого типа человека (старт-кодон подчеркнут).

CACCGAAAUGG

SEQ ID NO: 6. Модифицированная первая последовательность Козака UBE3A человека (старт-кодон подчеркнут) с пониженной иницирующей активностью.

UUUUUUAUGG

В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающего содержит вторую последовательность Козака, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или последовательности, идентичной ей на, по меньшей мере, примерно 50%, *например*, по меньшей мере, примерно 50%, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей. В некоторых вариантах осуществления, вторая последовательность Козака (*например*, SEQ ID NO: 8) функционально связана с короткой изоформой 1, *например*, путем замены или модификации последовательностей Козака изоформы 1 UBE3A дикого типа человека (SEQ ID NO: 7).

SEQ ID NO: 7. Короткая изоформа (изоформа 1) последовательности Козака UBE3A дикого типа человека (стартовый кодон подчеркнут).

AGCCGAAUGA

SEQ ID NO: 8. Модифицированная вторая последовательность Козака UBE3A человека (стартовый кодон подчеркнут) с повышенной иницирующей активностью.

AGCAGGAAUGA

В некоторых вариантах осуществления единственные кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности открытой рамки считывания UBE3A млекопитающего относятся к одной или обоим последовательностям Козака, как показано на **ФИГ. 14** для UBE3A человека. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные (в дополнение к последовательностям Козака) кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности находятся в пределах открытой рамки считывания UBE3A млекопитающего, чтобы влиять на экспрессию в клетках млекопитающих. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» включает, но не ограничивается ими, человека, приматов, приматов, не относящихся к человеку (*например*, обезьян и бабуинов), крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, кроликов, грызунов (*например*, крыс, мышей, хомяков и подобных) и *т.д.* Оптимизация кодонов является методикой, хорошо известной в данной области техники, и известны оптимальные кодоны для экспрессии у различных видов. Использование кодон-оптимизированной последовательности UBE3A позволяет отличить экспрессию трансдуцированной последовательности от экспрессии эндогенной последовательности UBE3A у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий

открытую рамку считывания UBE3A человека по настоящему изобретению, может быть кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках человека.

В некоторых вариантах осуществления, кодон-оптимизированная открытая рамка считывания UBE3A содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, или последовательности на, по меньшей мере, примерно 70% идентичной ей, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 76, 77, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе последовательности Козака в SEQ ID NO: 27 (**ФИГ. 14**) дополнительно не модифицированы, в то время как другие нуклеотидные последовательности дополнительно кодон-оптимизированы для создания открытой рамки считывания UBE3A, которая на, по меньшей мере, примерно 70% идентична соответствующим последовательностям в SEQ ID NO: 27 (**ФИГ. 14**), *например*, по меньшей мере, примерно 70, 75, 76, 77, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны, если исключить последовательности Козака из сравнения, тем самым сохраняя последовательность Козака (SEQ ID NO: 8), функционально связанную с короткой изоформой 1, и/или последовательность Козака (SEQ ID NO: 6), функционально связанную с изоформой 3 или изоформой 2.

SEQ ID NO: 9. Кодон-оптимизированная открытая рамка считывания изоформы 1 и изоформы 3 UBE3A человека (hUBE3A1>>3)

ATGGCCACAGCTTGTAAGATCAGGAGAACCTCAGTCTGACGACATTGAAG
CTAGCAGGATGAAGAGAGCCGCCGCAAAGCACCTGATCGAACGCTACTACCATCAG
CTCACCGAGGGTTGCGGCAACGAAGCGTGTACCAACGAGTTCTGTGCCTCCTGCCCC
ACGTTCTGCGGATGGATAACAATGCCGCCGCAATCAAGGCGCTTGAAGTGTATAA
GATCAACGCCAAGCTGTGCGATCCCCACCCTTCCAAGAAGGGAGCCAGCTCAGCCT
ACCTGGAAACTCCAAGGGCGCCCCCTAACAATCATGCTCCGAGATCAAGATGAAT
AAGAAGGGCGCCCGGATTGACTTCAAGGATGTGACCTACCTGACCGAGGAGAAGGT
GTACGAGATCCTGGAAGTCTGCCGAGAACGGGAGGACTACTCCCCTCTGATCCGCGT
GATCGGAAGAGTGTTTCAAGCTCCGCTGAAGCGCTCGTGACGTCGTTTCAAGAAAGGTCA
AGCAGCACACTAAGGAAGAACTCAAGTCCCTGCAGGCCAAAGATGAGGATAAGGA
CGAAGATGAAAAAGAAAAGGCCGCCTGCTCAGCTGCCGCGATGGAAGAAGATTCA
GAGGCCTCCAGCAGCAGGATTGGCGACAGCTCCCAGGGGGACAACAACCTCCAGAA
GCTGGGTCCAGACGATGTGTGCGGTGGACATCGACGCCATTTCGGAGAGTGTACACCC
GACTGCTCTCGAACGAAAAGATCGAGACTGCATTCCTGAACGCCCTTGTCTACCTGA
GCCCCAACGTGGAATGCGACCTTACTTACCATAACGTCTACTCCCGGGACCCAACT
ACCTGAACCTGTTTCATCATCGTGATGGAAAACCGGAACCTCCATTCCCCCGAGTACC
TGGAATGGCCCTGCCCTGTTCTGCAAGGCCATGTCAAAGCTTCCGCTGGCCGCAC
AAGGAAAGCTGATCCGCTTGTGGTCCAAGTACAACGCGGACCAGATCAGACGCATG
ATGGAAACGTTCCAGCAACTGATTACTTACAAGGTCATCTCCAATGAGTTCAACTCC
CGGAATCTTGTGAACGACGATGATGCCATTGTGGCCGCCTCCAAATGCCTGAAGATG
GTCTACTATGCGAACGTCGTGGGCGGGGAAGTCGATACCAACCACAACGAGGAGGA

CGACGAGGAACCTATCCCTGAGTCATCAGAACTGACTCTGCAAGAACTGCTGGGCG
AAGAACGCCGGAACAAGAAGGGCCCAAGAGTCGACCCGTTGGAAACCGAACTGGG
AGTCAAAACCCTGGACTGCAGAAAGCCTCTGATCCCGTTCGAAGAGTTCATCAACG
AACCCCTGAACGAGGTGCTGGAAATGGACAAGGACTACACCTTCTTCAAGGTCGAA
ACCGAGAACAAGTTCTCTTTCATGACTTGCCCGTTCATTCTGAACGCAGTGACCAAG
AACCTGGGCCTCTACTACGACAACCGCATCCGCATGTACAGCGAACGCCGCATCAC
CGTGCTGTACTCCCTGGTGCAAGGCCAACAGCTGAACCCCTACCTTCGCCTGAAAGT
CCGCCGCGACCATATCATTGATGACGCTCTCGTGCGCCTTGAGATGATCGCGATGGA
GAACCCCGCAGATCTGAAGAAGCAGCTCTACGTCGAGTTCGAAGGAGAACAGGGGG
TGGACGAAGGAGGAGTGTCCAAGGAGTTCTTTCAGCTCGTGGTGGAGGAAATCTTT
AACCTGACATCGGAATGTTACCTATGACGAATCCACAAAGCTGTTTTGGTTTAAC
CCGTCCTCGTTCGAAACTGAGGGTCAATTCACCCTCATCGGCATTGTGCTGGGACTC
GCCATCTACAACAATTGCATCCTCGACGTGCACTTCCCGATGGTGGTGTACCGCAAA
CTGATGGGCAAAAAGGGAACCTTCAGAGATCTGGGAGACTCACACCCGGTGCTGTA
CCAGTCGCTCAAGGACTTGTTGGAATACGAAGGGAACGTGGAAGATGATATGATGA
TTACCTTCCAAATCTCGCAGACTGACTTGTTTGGAAACCCTATGATGTACGACCTGA
AGGAGAATGGAGACAAGATCCCGATCACGAACGAAAACCGCAAGGAGTTCGTCAA
CCTGTACTCCGACTATATTCTGAACAAGAGCGTGGAGAAGCAGTTTAAGGCTTTCCG
CCGGGGATTCCACATGGTCACCAACGAAAGCCCGCTCAAGTACCTCTTTCGGCCCCGA
AGAGATTGAACTGCTGATCTGCGGGTCGAGGAATCTGGACTTCCAGGCCCTTGAAG
AGACTACTGAGTACGACGGAGGCTATACCCGGGACTCCGTGCTGATAAGAGAGTTC
TGGGAGATCGTGCACTCCTTCACCGATGAGCAGAAGCGGCTGTTCTCCAATTCACC
ACCGGCACTGACAGAGCGCCAGTCGGAGGACTGGGGAAGCTGAAGATGATCATTGC
GAAGAACGGTCCCGACACTGAGAGGTTGCCCACTTCCCACACTTGTTTCAACGTGCT
GCTGCTCCCGGAGTACTCCTCCAAGGAGAAGCTGAAGGAACGGCTCCTGAAGGCCA
TTACATACGCCAAAGGTTTCGGCATGCTTTAATGA

Другой аспект изобретения относится к кассете экспрессии, содержащей полинуклеотид, содержащий открытую рамку считывания UBE3A млекопитающего (*например*, человека) по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является кодон-оптимизированная последовательность человека, *например*, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей, по меньшей мере, примерно на 70%, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80., 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную ей. В различных вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, нуклеотидная последовательность UBE3A SEQ ID NO: 9 дополнительно включает дополнительные 5' последовательности пар оснований (*например*, 6 тиминов, чтобы получить модифицированную последовательность Козака из SEQ ID NO: 6), чтобы включить первую последовательность Козака.

Открытая рамка считывания UBE3A в кассете экспрессии может быть функционально связана с одним или несколькими элементами экспрессии, которые могут

модифицировать (т.е. усиливать или снижать или ограничивать) экспрессию UBE3A и/или Е6АР, такими как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, сигналы локализации и/или другие элементы экспрессии, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид функционально связан с промотором, *например*, нейрон-специфическим промотором, *например*, синапсином человека (hSYN), нейрон-специфической енолазой (NSE), тубулином альфа 1 (Ta1), MeCP2 (MeP).

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид функционально связан с промотором синапсина человека, *например*, промотором, содержащим, состоящим по существу из или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10 или последовательности, идентичной ей, по меньшей мере примерно на 70%, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей.

SEQ ID NO: 10. Промотор синапсина человека (hSYN)

GGTACCAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGG
CGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAAC
CCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGC
GGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCG
CCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACCTCGC
CGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCGCCGG
CCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCAT
CTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGG
AGTCGTGTCTGTCCTGAGAGCGCAGTC

В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A функционально связана с сигналом полиаденилирования, *например*, сигналом полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (bGHpA), *например*, сигналом полиаденилирования, содержащим, состоящим по существу из или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11 или последовательности, идентичной ей, по меньшей мере, примерно на 70%, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей.

SEQ ID NO: 11. Сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGHpA)

CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCC
TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAACAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC
TCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCT

В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A функционально связана с сигналом полиаденилирования, *например*, синтетическим polyA (SpA), *например*, сигналом полиаденилирования, содержащим, состоящим по существу

или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12 или последовательности, по меньшей мере, примерно на 70% идентичной ей, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей.

SEQ ID NO: 12. Синтетический сигнал полиаденилирования (SpA)

AATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A функционально связана с сигналом полиаденилирования, *например*, сигналом полиаденилирования вируса 40 обезьян (SV40) (SV40pA), *например*, сигналом полиаденилирования, содержащим, состоящим по существу из или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или последовательности, идентичной ей, по меньшей мере, примерно на 70%, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей.

SEQ ID NO: 13. Сигнал полиаденилирования SV40 (SV40pA)

AGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAGAATGCAG
TGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA
TAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT

Специалисты в данной области техники также поймут, что различные элементы промотора/энхансера могут применяться в зависимости от желаемого уровня и тканеспецифичности экспрессии. Промотор/энхансер может быть конститутивным или индуцируемым, в зависимости от желаемого профиля экспрессии. Промотор/энхансер может быть нативным или чужеродным и может быть природной или синтетической последовательностью. Под чужеродным подразумевается, что область инициации транскрипции не обнаруживается в хозяине дикого типа, в которого введена область инициации транскрипции.

Элементы промотора/энхансера могут быть нативными для клетки-мишени или субъекта, подлежащего лечению, и/или нативными для гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. Элемент промотора/энхансера обычно выбирают так, чтобы он функционировал в интересующей клетке-мишени. В типовых вариантах осуществления, промоторным/энхансерным элементом является промоторный/энхансерный элемент млекопитающих. Промоторный/энхансерный элемент может быть конститутивным или индуцируемым.

Индукцируемые элементы контроля экспрессии обычно используют в тех случаях, когда желательно обеспечить регуляцию экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. Индуцируемые промоторные/энхансерные элементы для доставки генов могут быть тканеспецифичными или тканепредпочтительными промоторными/энхансерными элементами и включают специфичные или предпочтительные для мышц (включая сердечные, скелетные и/или гладкие мышцы), специфические или предпочтительные для нервной ткани (включая специфические для мозга), глаза (включая специфичные для сетчатки и роговицы), специфичные или

предпочтительные для печени, специфичные или предпочтительные для костного мозга, специфичные или предпочтительные для поджелудочной железы, специфичные или предпочтительные для селезенки, и специфичные или предпочтительные для легких промоторные/энхансерные элементы. Другие индуцируемые промоторные/энхансерные элементы включают элементы, индуцируемые гормонами и металлами. Примеры индуцируемых промоторных/энхансерных элементов включают, но не ограничиваются ими, элемент включения/выключения Tet, RU486-индуцируемый промотор, экдизон-индуцируемый промотор, рапамицин-индуцируемый промотор и промотор металлотионеина.

В вариантах осуществления, в которых открытая рамка считывания UBE3A транскрибируется, и затем транслируется в клетках-мишенях, обычно используют специфические сигналы инициации для эффективной трансляции вставленных последовательностей, кодирующих белок. Эти экзогенные трансляционные контрольные последовательности, которые могут включать кодон инициации ATG (*т.е.* сайт начала трансляции) и соседние последовательности, могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Неограничивающие примеры этих дополнительных экзогенных контрольных трансляционных последовательностей включают последовательности Козака (*например*, дополнительные консенсусные последовательности Козака).

В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии дополнительно содержит, по меньшей мере, один инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, два AAV ITR. Два ITR могут иметь одинаковую нуклеотидную последовательность или разные нуклеотидные последовательности. AAV ITR могут быть из любого серотипа или изолята AAV (*например*, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13 или любого, указанного в таблице 1). В некоторых вариантах осуществления, ITR происходит из AAV2. Каждый ITR независимо может быть последовательностью дикого типа или модифицированной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный ITR может иметь делецию D-элемента (WO 01/92551). Удаление D-элемента определяется как удаление части ITR, известной как D-элемент. Альтернативно, D-элемент может называться или быть известен как D-область или D-последовательность, и/или нуклеотиды ITR, которые не образуют палиндромных шпильчатых структур. В некоторых вариантах осуществления, кассетой экспрессии является одноцепочечный вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, кассетой экспрессии является геном AAV, *например*, самокомплементарный геном AAV.

В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит промотор, открытую рамку считывания UBE3A млекопитающего и сайт полиаденилирования, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета

экспрессии содержит промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека и сайт полиаденилирования, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV ITR, промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека, сайт полиаденилирования и AAV ITR, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека и сайт полиаденилирования bGH, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии содержит AAV ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, сайт полиаденилирования bGH и AAV ITR, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека, сайт полиаденилирования bGH и AA2V ITR, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу UBE3A человека, сайт полиаденилирования bGH и AA2V ITR, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу UBE3A человека (*т.е.* изоформу 1) и длинную изоформу 3, сайт полиаденилирования bGH и AA2V ITR, необязательно в указанном порядке. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу 2 UBE3A человека, сайт полиаденилирования bGH и AAV2 ITR, необязательно в указанном порядке. Вышеупомянутые компоненты функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу UBE3A человека и длинную изоформу человека (то есть либо изоформу 2, либо 3) и дополнительно содержащую одну или несколько последовательностей Козака, содержащую, состоящую по существу из или состоящую из SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8 или последовательности, по меньшей мере примерно на 50% идентичной им, *например*, по меньшей мере, примерно на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной им, сайт полиаденилирования bGH и AA2V ITR, необязательно в указанном порядке. Вышеупомянутые компоненты функционально связаны.

В некоторых вариантах осуществления, кассета экспрессии содержит, состоит по существу из или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или последовательности, идентичной ей по меньшей мере примерно на 70%, *например*, по меньшей мере, примерно на 70, 75, 80, 85, 90., 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей.

SEQ ID NO: 14. Кассета экспрессии UBE3A человека, за исключением ITR

GAATTCGGTACCAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGG
 ATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCA
 CCCAACCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGGAGGGGAAACA
 GGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCG
 CCCCCGCTTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTC
 ACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGC
 CGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGGCACGGGCGC
 GACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAG
 CGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCTCTCCGATTTTTTATGGCCACAGC
 TTGTAAAAGATCAGGAGAACCTCAGTCTGACGACATTGAAGCTAGCAGGATGAAGA
 GAGCCGCCGCAAAGCACCTGATCGAACGCTACTACCATCAGCTCACCGAGGGTTGC
 GGCAACGAAGCGTGTACCAACGAGTTCTGTGCCTCCTGCCCCACGTTCTTGC GGATG
 GATAACAATGCCGCCGCAATCAAGGCGCTTGAACGTATAAGATCAACGCCAAGCT
 GTGCGATCCCCACCCTTCCAAGAAGGGAGCCAGCTCAGCCTACCTGGAAAACCTCCA
 AGGGCGCCCCTAACAACCTCATGCTCCGAGATCAAGATGAATAAGAAGGGCGCCCGG
 ATTGACTTCAAGGATGTGACCTACCTGACCGAGGAGAAGGTGTACGAGATCCTGGA
 ACTCTGCCGAGAACGGGAGGACTACTCCCCTCTGATCCGCGTGATCGGAAGAGTGTT
 CAGCTCCGCTGAAGCGCTCGTGCAAGTCGTTTCAAGAAAGGTCAAGCAGCACACTAAGG
 AAGAACTCAAGTCCCTGCAGGCCAAAGATGAGGATAAGGACGAAGATGAAAAAGA
 AAAGGCCGCCTGCTCAGCTGCCGCGATGGAAGAAGATTCAGAGGCCTCCAGCAGCA
 GGATTGGCGACAGCTCCCAGGGGGACAACAACCTCCAGAAGCTGGGTCCAGACGAT
 GTGTCGGTGGACATCGACGCCATTCGGAGAGTGTACACCCGACTGCTCTCGAACGA
 AAAGATCGAGACTGCATTCCTGAACGCCCTTGTCTACCTGAGCCCGAACGTGGAATG
 CGACCTTACTTACCATAACGTCTACTCCCGGGACCCAAACTACCTGAACCTGTTTCAT
 CATCGTGATGGAAAACCGGAACCTCCATTCCCCCGAGTACCTGGAAATGGCCCTGCC
 CCTGTTCTGCAAGGCCATGTCAAAGCTTCCGCTGGCCGCACAAGGAAAGCTGATCCG
 CTTGTGGTCCAAGTACAACGCGGACCAGATCAGACGCATGATGGAAACGTTCCAGC
 AACTGATTACTTACAAGGTCATCTCCAATGAGTTCAACTCCCGGAATCTTGTGAACG
 ACGATGATGCCATTGTGGCCGCCTCCAAATGCCTGAAGATGGTCTACTATGCGAACG
 TCGTGGGCGGGGAAGTCGATACCAACCACAACGAGGAGGACGACGAGGAACCTAT
 CCCTGAGTCATCAGAACTGACTCTGCAAGAACTGCTGGGCGAAGAACGCCGGAACA
 AGAAGGGCCCAAGAGTCGACCCGTTGGAAACCGAACTGGGAGTCAAAACCCTGGAC
 TGCAGAAAGCCTCTGATCCCGTTTCAAGAGTTCATCAACGAACCCCTGAACGAGGT
 GCTGGAAATGGACAAGGACTACACCTTCTTCAAGGTCGAAACCGAGAACAAGTTCT
 CTTTCATGACTTGGCCGTTTATTCTGAACGCAGTGACCAAGAACCTGGGCCTCTACT
 ACGACAACCGCATCCGCATGTACAGCGAACGCCGCATCACCGTGCTGTACTCCCTGG
 TGCAAGGCCAACAGCTGAACCCCTACCTTCGCCTGAAAGTCCGCCGCGACCATATCA
 TTGATGACGCTCTCGTGCGCCTTGAGATGATCGCGATGGAGAACCCCGCAGATCTGA
 AGAAGCAGCTCTACGTCGAGTTTCAAGGAGAACAGGGGGGTGGACGAAGGAGGAGT
 GTCCAAGGAGTTCTTTCAGCTCGTGGTGGAGGAAATCTTTAACCCTGACATCGGAAT

GTTCACCTATGACGAATCCACAAAGCTGTTTTGGTTTAACCCGTCCTCGTTTCGAAAC
 TGAGGGTCAATTCACCCTCATCGGCATTGTGCTGGGACTCGCCATCTACAACAATTG
 CATCCTCGACGTGCACTTCCCGATGGTGGTGTACCGCAAACCTGATGGGCAAAAAGG
 GAACCTTCAGAGATCTGGGAGACTCACACCCGGTGCTGTACCAGTCGCTCAAGGAC
 TTGTTGGAATACGAAGGGAACGTGGAAGATGATATGATGATTACCTTCCAAATCTCG
 CAGACTGACTTGTTTGGAAACCCTATGATGTACGACCTGAAGGAGAATGGAGACAA
 GATCCCGATCACGAACGAAAACCGCAAGGAGTTCGTCAACCTGTACTCCGACTATA
 TTCTGAACAAGAGCGTGGAGAAGCAGTTTAAGGCTTTCGCGCGGGGATTCCACATG
 GTCACCAACGAAAGCCCGCTCAAGTACCTCTTTCGGCCCCGAAGAGATTGAACTGCTG
 ATCTGCGGGTCGAGGAATCTGGACTTCCAGGCCCTTGAAGAGACTACTGAGTACGA
 CGGAGGCTATACCCGGGACTCCGTGCTGATAAGAGAGTTCTGGGAGATCGTGCCT
 CCTTCACCGATGAGCAGAAGCGGCTGTTCTCCAATTCACCACCGGCACTGACAGAG
 CGCCAGTCGGAGGACTGGGGAAGCTGAAGATGATCATTGCGAAGAACGGTCCCGAC
 ACTGAGAGGTTGCCCACTTCCCACACTTGTTTCAACGTGCTGCTGCTCCCGGAGTAC
 TCCTCCAAGGAGAAGCTGAAGGAACGGCTCCTGAAGGCCATTACATACGCCAAAGG
 TTTCGGCATGCTTTAATGACTCGAGCGGCCGCGGGATCCCTCGAGACTGTGCCTTCT
 AGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG
 CCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
 GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGG
 GAAGACAACAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA
 AAGAACCAGCTGACCGCGT

Другой аспект изобретения относится к вектору, содержащему полинуклеотид или кассету экспрессии, описанные в настоящем документе. Подходящие векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиду, фаг, вирусный вектор (*например*, вектор AAV, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, герпесвирусный вектор, альфавирусный вектор или бакуловирусный вектор), искусственную бактериальную хромосому (BAC) или искусственную дрожжевую хромосому (YAC). Например, нуклеиновая кислота может содержать, состоять или состоять по существу из вектора AAV, содержащего 5' и/или 3' концевой повтор (*например*, 5' и/или 3' концевой повтор AAV). В некоторых вариантах осуществления, вектором является средство доставки, такое как частица (*например*, микрочастица или наночастица) или липосома, к которой прикреплена кассета экспрессии или в которую встроена кассета экспрессии. Вектор может быть любым средством доставки, подходящим для переноса кассеты экспрессии в клетку. В некоторых вариантах осуществления, вектором может быть нейротропный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, вектором является вирусный вектор, *например* лентивирусный вектор и/или вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектором является вектор AAV. Вектор AAV может быть любым серотипом или изолятом AAV (*например*, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13 или любого, указанного в

таблице 1). В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является вектор AAV9. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV может быть AAV9 и/или производный от AAV9 вариант, такой как, но не ограниченный ими, РНР.В, РНР.еВ или AAV9.HR. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV может быть синтетический вектор AAV, *например*, Anc80. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV может содержать капсидные белки дикого типа. В других вариантах осуществления, вектор AAV может содержать модифицированный капсидный белок с измененным тропизмом по сравнению с капсидным белком дикого типа, *например*, модифицированный капсидный белок не таргетирует печень или имеет повышенный тропизм для определенных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, вектором является одноцепочечный вектор AAV (ssAAV). В некоторых вариантах осуществления, вектором является самокомплементарный или дуплексный вектор AAV (scAAV). Векторы scAAV описаны в международной патентной публикации WO 01/92551 (описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Использование scAAV для экспрессии ORF UBE3A может обеспечить увеличение количества трансдуцированных клеток, количества копий на трансдуцированную клетку или того и другого.

Дополнительный аспект изобретения относится к трансформированной клетке, содержащей полинуклеотид, кассету экспрессии и/или вектор по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кассета экспрессии и/или вектор стабильно включены в геном клетки. Клетка может быть клеткой *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Другой аспект изобретения относится к трансгенному животному, содержащему полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, животным является лабораторное животное, *например*, мышь, крыса, кролик, собака, обезьяна или примат, отличный от человека.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтическому составу, содержащему полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе.

В конкретном варианте осуществления, полинуклеотид, кассета экспрессии, вектор и/или трансформированная клетка по настоящему изобретению являются выделенными.

В другом конкретном варианте осуществления, полинуклеотид, кассета экспрессии, вектор и/или трансформированная клетка по настоящему изобретению являются очищенными.

Способы получения вирусных векторов

Настоящее изобретение также относится к способам получения вирусных векторов. В одном конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение представляет способ получения рекомбинантной частицы AAV, включающий предоставление клетке, допускающей репликацию AAV: (а) рекомбинантной матрицы AAV, содержащей (i)

полинуклеотид или кассету экспрессии по настоящему изобретению, и (ii) ITR; (b) полинуклеотид, содержащий Rep кодирующие последовательности и Cap кодирующие последовательности; в условиях, достаточных для репликации и упаковки рекомбинантной матрицы AAV; посредством чего рекомбинантные частицы AAV продуцируются в клетке. Условиями, достаточными для репликации и упаковки рекомбинантного шаблона AAV могут быть, *например*, наличие AAV последовательностей, достаточных для репликации шаблона AAV и инкапсидирования в AAV капсид (*например*, AAV гер последовательности и AAV сар последовательности) и вспомогательных последовательности из аденовируса и/или герпесвируса. В конкретных вариантах осуществления, матрица AAV содержит две последовательности AAV ITR, которые расположены 5' и 3' от полинуклеотида по изобретению, хотя они не обязательно должны быть непосредственно непрерывными с ним.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная матрица AAV содержит ITR, который не разрешается через Rep с образованием дуплексных векторов AAV, как описано в международной патентной публикации WO 01/92551.

Матрица AAV и последовательности гер и сар AAV представлены в таких условиях, что вирусный вектор, содержащий матрицу AAV, упакованную в капсид AAV, продуцируется в клетке. Способ может дополнительно включать стадию сбора вирусного вектора из клетки. Вирусный вектор можно собирать из среды и/или лизируя клетки.

Клеткой может быть клетка, допускающая репликацию вируса AAV. Может быть использована любая подходящая клетка, известная в данной области. В конкретных вариантах осуществления клеткой является клетка млекопитающего (*например*, клетка приматов или человека). В качестве другого варианта, клеткой может быть транс-комплементарная упаковывающая клеточная линия, которая обеспечивает функции, удаленные из дефектного по репликации вируса-помощника, *например* клетки 293 или другие транс-комплементарные клетки E1a.

Последовательности репликации AAV и капсида могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. Современные протоколы обычно экспрессируют гены AAV гер/сар на одной плазмиде. Последовательности репликации и упаковки AAV необязательно предоставлять вместе, хотя это может быть удобно. Последовательности AAV гер и/или сар могут быть предоставлены любым вирусным или не вирусным вектором. Например, последовательности гер/сар могут быть предоставлены гибридным аденовирусным или герпесвирусным вектором (*например*, вставлены в области E1a или E3 удаленного аденовирусного вектора). Векторы EBV также можно использовать для экспрессии генов AAV сар и гер. Одним из преимуществ этого способа является то, что векторы EBV являются эписомными, но при этом сохраняют высокое количество копий на протяжении последовательных клеточных делений (*т.е.* стабильно интегрируются в клетку в качестве внехромосомных элементов, обозначенных как «ядерная эписома на основе EBV», *см.* Margolski, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:67).

В качестве дополнительной альтернативы последовательности гер/сар могут быть стабильно включены в клетку.

Обычно последовательности AAV гер/сар не будут фланкированы TR, чтобы предотвратить восстановление и/или упаковку этих последовательностей.

Матрица AAV может быть предоставлена в клетку с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, матрица может поставляться не вирусным (*например*, плазмидным) или вирусным вектором. В конкретных вариантах осуществления, матрица AAV поставляется вектором вируса герпеса или аденовируса (*например*, вставляется в области E1a или E3 удаленного аденовируса). В качестве другой иллюстрации, Palombo et al., (1998) J. Virology 72:5025 описывает бакуловирусный вектор, несущий репортерный ген, фланкированный AAV TR. Векторы EBV также могут использоваться для доставки матрицы, как описано выше в отношении генов гер/сар.

В другом типовом варианте осуществления, матрица AAV предоставляется реплицирующимся rAAV вирусом. В других вариантах осуществления, AAV провирус, содержащий AAV матрицу, стабильно интегрирован в хромосому клетки.

Для повышения титров вируса, клетке могут быть предоставлены функции вируса-помощника (*например*, аденовируса или герпесвируса), которые способствуют продуктивной инфекции AAV. Последовательности вируса-помощника, необходимые для репликации AAV, известны в данной области техники. Обычно эти последовательности обеспечиваются вектором аденовируса-помощника или вируса герпеса-помощника. Альтернативно, последовательности аденовируса или вируса герпеса могут быть предоставлены другим не вирусным или вирусным вектором, *например*, в виде неинфекционной миниплазмиды аденовируса, которая несет все гены-помощники, которые способствуют эффективному продуцированию AAV, как описано Ferrari et al., (1997) Nature Med. 3:1295, и в патентах США №№ 6,040,183 и 6,093,570.

Кроме того, функции вируса-помощника могут обеспечиваться упаковывающей клеткой с хелперными последовательностями, встроенными в хромосому или поддерживаемыми в качестве стабильного вне хромосомного элемента. Как правило, последовательности вируса-помощника не могут быть упакованы в вирионы AAV, *например*, они не фланкированы ITR.

Специалисты в данной области техники поймут, что может быть выгодно обеспечить репликацию AAV и последовательности капсида и последовательности вируса-помощника (*например*, последовательности аденовируса) в одной хелперной конструкции. Эта хелперная конструкция может быть не вирусной или вирусной. В качестве одной не ограничивающей иллюстрации, хелперной конструкцией может быть гибридный аденовирус или гибридный вирус герпеса, содержащий гены AAV гер/сар.

В одном конкретном варианте осуществления, последовательности AAV гер/сар и хелперные последовательности аденовируса поставляют с помощью одного вектора-помощника аденовируса. Этот вектор может дополнительно содержать матрицу AAV. Последовательности AAV гер/сар и/или матрица AAV могут быть вставлены в удаленную

область (*например*, области E1a или E3) аденовируса.

В другом варианте осуществления, последовательности AAV гер/сар и хелперные последовательности аденовируса поставляют с помощью одного вектора-помощника аденовируса. Согласно этому варианту осуществления, матрица AAV может быть предоставлена как матрица плазмиды.

В другом иллюстративном варианте осуществления, последовательности AAV гер/сар и хелперные последовательности аденовируса поставляют с помощью одного вектора-помощника аденовируса, и матрица AAV интегрирована в клетку как провирус. Альтернативно, матрица AAV обеспечивается вектором EBV, который поддерживается внутри клетки как вне хромосомный элемент (*например*, как ядерная эписома на основе EBV).

В дополнительном типовом варианте осуществления, последовательности AAV гер/сар и хелперные последовательности аденовируса обеспечиваются одним аденовирусным помощником. Матрица AAV может быть предоставлена как отдельный реплицирующийся вирусный вектор. Например, матрица AAV может быть предоставлена частицей AAV или второй рекомбинантной частицей аденовируса.

Согласно указанным выше способам гибридный аденовирусный вектор обычно содержит 5' и 3' *цис* последовательности аденовируса, достаточные для репликации и упаковки аденовируса (*т.е.* концевые повторы аденовируса и последовательность PAC). Последовательности AAV гер/сар и, если они присутствуют, матрица AAV встроены в скелет аденовируса и фланкированы 5' и 3' *цис* последовательностями так, что эти последовательности могут быть упакованы в капсиды аденовируса. Как описано выше, хелперные последовательности аденовируса и последовательности AAV гер/сар обычно не фланкируются ITR, так что эти последовательности не упаковываются в вирионы AAV.

Zhang et al. ((2001) Gene Ther. 18: 704-12) описывает химерный помощник, содержащий как аденовирус, так и гены AAV гер и сар.

Вирус герпеса также можно использовать в качестве вспомогательного вируса в способах упаковки AAV. Гибридные герпесвирусы, кодирующие белки AAV Rep, могут преимущественно способствовать масштабируемым схемам продуцирования вектора AAV. Был описан вектор гибридного вируса простого герпеса типа I (HSV-1), экспрессирующий гены AAV-2 гер и сар (Conway et al., (1999) Gene Ther. 6:986 и WO 00/17377).

В качестве дополнительной альтернативы, вирусные векторы по изобретению могут быть продуцированы в клетках насекомых с использованием бакуловирусных векторов для доставки генов гер/сар и матрицы AAV, как описано, например, Urabe et al., (2002) Human Gene Ther. 13:1935-43.

Запасы вектора AAV, свободные от загрязняющего вируса-помощника, можно получить любым способом, известным в данной области техники. Например, AAV и вирус-помощник можно легко дифференцировать по размеру. AAV также можно отделить от вируса-помощника на основании сродства к субстрату гепарина (Zolotukhin et al. (1999)

Gene Therapy 6:973). Можно использовать удаленные дефектные по репликации вирусы-помощники, так чтобы любой загрязняющий вспомогательный вирус не был способен к репликации. В качестве дополнительной альтернативы может использоваться аденовирус-помощник, у которого отсутствует поздняя экспрессия гена, поскольку требуется только экспрессия раннего гена аденовируса, чтобы опосредовать упаковку AAV. Мутанты аденовируса, дефектные по поздней экспрессии генов, известны в данной области техники (*например*, мутанты аденовируса ts100K и ts149).

Способы использования векторов UBE3A

Настоящее изобретение также относится к способам доставки открытой рамки считывания UBE3A в клетку или субъекту для увеличения продуцирования UBE3A и/или Е6АР, *например*, для терапевтических или исследовательских целей *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vivo*. Таким образом, один аспект изобретения относится к способу экспрессии открытой рамки считывания UBE3A в клетке, включающему контакт клетки с полинуклеотидом, кассетой экспрессии и/или вектором по изобретению, тем самым вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A в клетке. В некоторых вариантах осуществления, клеткой является клетка *in vitro*, клетка *ex vivo* и/или клетка *in vivo*. Экспрессия настоящего изобретения *in vitro* может быть полезной для исследовательских целей, *например*, для экспрессии рекомбинантного белка, для изучения действия белка на клетку, для оценки эффективности и/или безопасности перед экспрессией *in vivo*, и/или разработки исследовательских и медицинских способов диагностики и/или скрининга.

Другой аспект изобретения относится к способу экспрессии открытой рамки считывания UBE3A у субъекта, включающему доставку субъекту полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по настоящему изобретению, вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является животная модель нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A.

Другой аспект изобретения относится к способу лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A (*например*, Е6АР) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему доставку субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по изобретению для вылечивания нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта. В изобретении предлагается способ лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта. В изобретении предлагается способ лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A (*например*, Е6АР) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку по изобретению так, чтобы открытая рамка считывания UBE3A экспрессировалась у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, нарушением, связанным с aberrантной экспрессией гена

UBE3A или продукта гена, может быть синдром Эйнджелмена.

В изобретении дополнительно предложен способ лечения синдрома Эйнджелмена у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки по настоящему изобретению так, что открытая рамка считывания UBE3A экспрессируется к субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют субъекту, *например*, системно (*например*, внутривенно) или непосредственно в центральную нервную систему (*например*, в спинномозговую жидкость интратекальной или внутрижелудочковой или мостомозжечковой инъекцией) субъекта. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интрацеребровентрикулярно.

Рекомбинантные вирусные векторы по настоящему изобретению находят применение как в ветеринарии, так и в медицине. Подходящие субъекты включают птиц, рептилий, земноводных, рыб и млекопитающих. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» включает, но не ограничивается ими, человека, приматов, приматов, не относящихся к человеку (*например*, обезьян и бабуинов), крупный рогатый скот, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, кроликов, грызунов (*например*, крыс, мышей, хомяков и подобных) и *т.д.* Субъекты-люди включают эмбрионы, зародыши, новорожденных, младенцев, подростков и взрослых. Необязательно, субъект «нуждается» в способах по настоящему изобретению, *например*, потому что субъект имеет или считается подверженным риску заболевания, включая описанные в настоящем документе, или которому будет полезна доставка полинуклеотида, в том числе описанного в настоящем документе. В качестве дополнительного варианта, субъектом может быть лабораторное животное и/или животная модель заболевания. Предпочтительно, субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид по изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в этом, как можно раньше в жизни субъекта, *например*, как только субъекту диагностируют aberrantную экспрессию или активность UBE3A и/или E6AP или любое из вышеупомянутых заболеваний или нарушений. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят новорожденному субъекту, *например*, после того, как скрининг новорожденных определил aberrantную экспрессию или активность UBE3A и/или E6AP. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят субъекту до возраста 10 лет, *например*, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят молодому или взрослому субъекту в возрасте старше 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят плод *in utero*, *например*, после того, как пренатальный скрининг определил

аберрантную экспрессию или активность UBE3A и/или E6AP или наличие одного из указанных выше заболеваний или нарушений. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят субъекту, как только у субъекта развиваются симптомы, связанные с аберрантной экспрессией или активностью UBE3A и/или E6AP, или возникает подозрение или диагностируется аберрантная экспрессия или активность UBE3A и/или E6AP, или одно из вышеописанных заболеваний или нарушений. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид вводят субъекту до того, как у субъекта разовьются симптомы, связанные с аберрантной экспрессией или активностью UBE3A и/или E6AP, или заболевание/нарушение, *например*, субъекту, у которого подозревается или диагностирована аберрантная экспрессия или активность UBE3A и/или E6AP, или одно из указанных выше заболеваний или нарушений, но симптомы еще не проявляются.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение представляет фармацевтическую композицию, содержащую полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе и, необязательно, другие лекарственные агенты, фармацевтические агенты, стабилизирующие агенты, буферы, носители, адъюванты, разбавители и *т. д.* Для инъекции, носителем обычно является жидкость. Для других способов введения, носитель может быть твердым или жидким. Для ингаляционного введения, носитель должен быть пригоден для вдыхания и, предпочтительно, имеет форму твердых или жидких частиц. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический носитель может содержать D-сорбит (*например*, PBS 5% масс./об. D-сорбита).

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается материал, который не является токсичным или нежелательным по другим причинам, *т.е.* материал можно вводить субъекту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов.

Одним из аспектов настоящего изобретения является способ переноса открытой рамки считывания UBE3A в клетку *in vitro*. Полинуклеотид, кассета экспрессии и/или вектор по изобретению могут быть введены в клетки в подходящем количестве. Вирусный вектор может быть введен в клетки при соответствующей множественности заражения в соответствии со стандартными способами трансдукции, подходящими для конкретных клеток-мишеней. Титры вирусного вектора или капсида для введения могут варьироваться в зависимости от типа и количества клеток-мишеней и конкретного вирусного вектора или капсида и могут быть определены специалистами в данной области техники без излишнего экспериментирования. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, примерно 10^3 инфекционных единиц, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 10^5 инфекционных единиц введены в клетку.

Клетки, в которые могут быть введены полинуклеотид, кассета экспрессии, и/или вектор по изобретению, *например*, вирусный вектор, могут быть любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, нервные клетки (включая клетки периферической и центральной нервной системы, в частности, клетки головного мозга, такие как нейроны, олигодендроциты, глиальные клетки, астроциты), клетки легкого, клетки глаза (в том

числе клетки сетчатки, пигментный эпителий сетчатки и клетки роговицы), клетки эпителиаля (*например*, клетки эпителия кишечника и дыхательных путей), клетки скелетных мышц (включая миобласты, мышечные трубочки и мышечные волокна), мышечные клетки диафрагмы, дендритные клетки, клетки поджелудочной железы (в том числе островковые клетки), клетки печени, клетки желудочно-кишечного тракта (в том числе гладкомышечные клетки, эпителиальные клетки), клетки сердца (в том числе кардиомиоциты), клетки костей (*например*, стволовые клетки костного мозга), гемопоэтические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки простаты, клетки суставов (включая, *например*, хрящи, мениски, синовиальный и костный мозг), зародышевые клетки, и подобные. Альтернативно, клеткой может быть любая клетка-предшественник. В качестве дополнительной альтернативы, клеткой может быть стволовая клетка (*например*, нейронная стволовая клетка, стволовая клетка печени). В еще одном альтернативном варианте, клеткой может быть раковая или опухолевая клетка. Кроме того, эти клетки могут происходить из любого вида, как указано выше.

Полинуклеотид, кассета экспрессии, и/или вектор по изобретению, *например*, вирусный вектор, могут быть введены в клетки *in vitro* с целью введения модифицированной клетки субъекту. В конкретных вариантах осуществления, клетки берут у субъекта, в них вводят полинуклеотид, кассету экспрессии и/или вектор по изобретению, *например*, вирусный вектор, и клетки затем помещают обратно в субъекта. Способы взятия клеток у субъекта для лечения *ex vivo*, с последующим введением обратно субъекту, известны в данной области техники (*см.*, *например*, патент США № 5,399,346). Альтернативно, полинуклеотид, кассету экспрессии и/или вектор по изобретению, *например*, вирусный вектор, вводят в клетки другого субъекта, в культивируемые клетки или в клетки из любого другого подходящего источника, и клетки вводят субъекту нуждающемуся в этом.

Клетки, подходящие для генной терапии *ex vivo*, описаны выше. Дозы клеток для введения субъекту будут варьироваться в зависимости от возраста, состояния и вида субъекта, типа клетки, нуклеиновой кислоты, экспрессируемой клеткой, способа введения и подобных. Обычно, по меньшей мере, от примерно 10^2 до примерно 10^8 или от примерно 10^3 до примерно 10^6 клеток вводят на дозу в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретных вариантах осуществления клетки, трансдуцированные вирусным вектором *ex vivo*, вводят субъекту в эффективном количестве в комбинации с фармацевтическим носителем.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ введения полинуклеотида, кассеты экспрессии и/или вектора по изобретению, *например*, вирусного вектора, субъекту. В конкретных вариантах осуществления, способ включает способ доставки открытой рамки считывания UBE3A животному, где способ включает: введение эффективного количества вирусного вектора по изобретению животному. Введение вирусных векторов по настоящему изобретению человеку или животному, нуждающемуся

в этом, может производиться любым способом, известным в данной области техники. Необязательно, вирусный вектор доставляется в эффективной дозе в фармацевтически приемлемом носителе.

Дозы вирусных векторов, вводимых субъекту, будут зависеть от способа введения, заболевания или состояния, подлежащего лечению, состояния отдельного субъекта, конкретного вирусного вектора и нуклеиновой кислоты, которую необходимо доставить, и могут быть определены рутинным образом. Типовыми дозами для достижения терапевтического эффекта являются титры вируса, по меньшей мере, примерно 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} трансдуцирующих единиц (ТУ) или более, *например*, примерно 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} ТУ, еще более предпочтительно, для дозы используют примерно 10^8 - 10^{14} ТЕ, или примерно 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} ТУ. Дозы и единицы трансдукции титра вируса могут быть рассчитаны как векторные или вирусные геномы (вг) и/или вг/кг субъекта. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет, по меньшей мере, примерно 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} вг/кг субъекта, *например*, примерно 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} вг/кг субъекта, или от 10^8 - 10^{14} вг/кг субъекта, в некоторых вариантах осуществления, примерно 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} вг/кг субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению может включать экспрессию и/или введение открытой рамки считывания UBE3A в дозе (*например*, вирусном титре) такой, чтобы короткая изоформа UBE3A экспрессировалась в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы, *например*, в соотношении примерно 11:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1 или 15:1 или любое значение или диапазон в нем. Например, в некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающих (*например*, человека) может быть введена таким образом, что короткая изоформа экспрессируется в соотношении от примерно 2:1 до примерно 4,5:1, от примерно 1:1 до примерно 10:1, от примерно 3:1 до примерно 8,5:1, или от примерно 3:1 до примерно 4:1, по сравнению с экспрессией длинной изоформы. В некоторых вариантах осуществления, открытая рамка считывания UBE3A млекопитающих (*например*, человека) может быть введена таким образом, что короткая изоформа экспрессируется в соотношении примерно 2,5:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 6,5:1, примерно 8:1 или примерно 10:1, по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

В конкретных вариантах осуществления, более чем одно введение (*например*, два, три, четыре или несколько введений) может быть использовано для достижения желаемого уровня экспрессии гена в течение различных интервалов, *например*, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно, и *т.д.*

Типовые способы введения включают пероральные, ректальные, трансмукозальное, местное, интраназальное, ингаляционное (*например*, с помощью аэрозоля), буккальное (*например*, сублингвальное), вагинальное, интратекальное,

внутриглазное, трансдермальное, *in utero* (или *in ovo*), парентеральное (*например*, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечной [включая введение в скелетную, диафрагмальную и/или сердечную мышцу], внутрикожное, внутривисцеральное, внутримозговое и внутрисуставное), местное (*например*, как для кожу, так и на слизистые поверхности, в том числе поверхности дыхательных путей и трансдермальное введение), интро-лимфатическое и тому подобные, а также прямую инъекции в ткань или орган (*например*, в печень, скелетные мышцы, сердечной мышцы, мышцы диафрагмы или мозг). Введение также может быть в опухоль (*например*, в или близкой к опухоли или лимфатическому узлу). Наиболее подходящий путь в любом настоящем случае будет зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению, и от природы конкретного вектора, который используется. В некоторых вариантах осуществления, может быть использована более чем одна схема и/или путь введения, например, интрапаренхимальное управление и интрацеребровентрикулярное введение.

В некоторых вариантах осуществления, вектор, содержащий кассету экспрессии (*например*, вирусный вектор, AAV вектор) вводят в ЦНС, периферическую нервную систему или обе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор вводят непосредственно в ЦНС, *например*, головной мозг или спинной мозг. Прямое введение может привести к высокой специфичности трансдукции клеток ЦНС, *например*, где, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95% или более из трансдуцированных клеток являются клетки ЦНС. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники для введения векторов непосредственно в ЦНС. Вектор может быть введен в спинной мозг, ствол мозга (продолговатый мозг, мост), средний мозг (гипоталамус, таламус, эпителиум, гипофиз, мозговой придаток, черную субстанцию, шишковидную железу), мозжечок, конечный мозг (полосатое тело, головной мозг, включая затылочную, височную, теменную и лобную долю, кору головного мозга, базальные ганглии, гиппокамп и миндалину), лимбическую систему, неокортекс, полосатое тело, мозг и нижний холмик четверохолмия. Вектор также можно вводить в различные области глаза, такие как сетчатка, роговица или зрительный нерв. Вектор может быть доставлен в спинномозговую жидкость (*например*, люмбальной пункцией) для более дисперсного введения вектора.

Вектор, содержащий кассету экспрессии (*например*, вирусный вектор, вектор AAV), может быть введен в желаемую область ЦНС любым путем, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, интратекальную, интрацеребральную, внутрижелудочковую, интрамостомозжечковую, интрапаренхимальную, интраназальную, интраауральную, внутриглазную (*например*, внутрь стекловидного тела, субретиальную, в переднюю камеру) и периокулярную (*например*, субтеноновую область) доставку или любую их комбинацию.

Вектор можно вводить способом, который вызывает более широкую диффузную трансдукцию тканей, включая ЦНС, периферическую нервную систему и/или другие ткани.

Обычно вектор, содержащий кассету экспрессии (например, вирусный вектор, вектор AAV), вводят в жидком составе путем прямой инъекции (*например*, стереотаксической инъекции) в желаемую область или компартмент в ЦНС и/или других тканях. В некоторых вариантах осуществления, вектор может быть доставлен через резервуар и/или насос. В других вариантах осуществления, вектор может быть доставлен путем местного нанесения на желаемую область или путем интраназального введения аэрозольного состава. Введение в глаз или в ухо может осуществляться путем местного нанесения жидких капель. В качестве дополнительной альтернативы вектор может быть введен в виде твердого препарата с медленным высвобождением. Контролируемое высвобождение парвовируса и векторов AAV описано в международной патентной публикации WO 01/91803.

Инъекционные агенты могут быть приготовлены в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, пригодных для приготовления раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вирусный вектор локально, а не системно, например, в виде депо или с состава с замедленным высвобождением. Кроме того, вирусный вектор может быть доставлен высушенным в хирургическую имплантируемую матрицу, такую как заменитель костного трансплантата, шов, стент и подобную (*например*, как описано в патенте США 7,201,898).

Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, облатки, лепешки или таблетки, каждая из которых содержит предварительно определенное количество композиции по настоящему изобретению; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной или не водной жидкости; или в виде эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле. Пероральная доставка может быть выполнена путем образования комплекса вирусного вектора по настоящему изобретению с носителем, способным выдерживать разложение пищеварительными ферментами в кишечнике животного. Примеры таких носителей включают пластмассовые капсулы или таблетки, как известно в данной области техники. Такие композиции получают любым подходящим способом фармации, который включает в себя стадию смешивания композиции и подходящего носителя (который может содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, как указано выше). В общем, фармацевтическую композицию в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения получают путем однородного и тщательного смешивания композиции с жидким или тонко измельченным твердым носителем, или обоими, и затем, если необходимо, формованием полученной смеси. Например, таблетка может быть получена путем прессования или формования порошка или гранул, содержащих композицию, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки получают путем прессования в подходящей машине композиции в свободнотекучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанной со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем и/или поверхностно-активным/диспергирующим агентами. Формованные таблетки получают

путем формования в подходящем устройстве порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким связующим.

Фармацевтические композиции, подходящие для буккального (сублингвального) введения, включают лепешки, содержащие композицию по настоящему изобретению в ароматизированной основе, обычно сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; и пастилки, содержащие композицию в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут включать стерильные водные и не водные инъекционные растворы композиции по настоящему изобретению, причем эти препараты необязательно изотоничны к крови предполагаемого реципиента. Эти препараты могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной к крови предполагаемого реципиента. Водные и не водные стерильные суспензии, растворы и эмульсии могут включать суспендирующие агенты и загустители. Примерами не водных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактатированный раствор Рингера или жирные масла. Внутривенные носители включают вещества для восполнения жидкости и питательных веществ, вещества для восполнения электролитов (например, на основе декстрозы Рингера) и подобные. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы, и подобные.

Композиции могут быть представлены в контейнерах для однократной дозы или нескольких доз, например, в герметично запечатанных ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном вымораживании (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, солевого раствора или воды для инъекций, непосредственно перед использованием.

Приготовленные для немедленного приема инъекционные растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного типа. Например, может быть представлена инъекционная, стабильная, стерильная композиция по настоящему изобретению в стандартной дозированной форме в герметичном контейнере. Композиция может быть представлена в виде лиофилизата, который может быть восстановлен с соответствующим фармацевтический приемлемым носителем с образованием жидкой композиции, подходящей для инъекции субъекту. Стандартная дозированная форма может составлять от примерно 1 мкг до примерно 10 г композиции по настоящему изобретению. Когда композиция является по существу нерастворимой в воде, достаточное количество эмульгатора, который является физиологически приемлемым, может быть включено в количестве, достаточном для

эмульгирования композиции в водном носителе. Одним из таких подходящих эмульгирующих агентов является фосфатидилхолин.

Фармацевтические композиции, подходящие для ректального введения, могут быть представлены в виде суппозиторий со стандартной дозой. Их можно приготовить путем смешивания композиции с одним или несколькими обычными твердыми носителями, такими как, например, масло какао, и затем формования полученной смеси.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для местного нанесения на кожу, могут иметь форму мази, крема, лосьона, пасты, геля, спрея, аэрозоля или масла. Носители, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, спирты, трансдермальные усилители и комбинации двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления, например, местная доставка может осуществляться путем смешивания фармацевтической композиции по настоящему изобретению с липофильным реагентом (*например*, ДМСО), который способен проникать в кожу.

Фармацевтические композиции, подходящие для трансдермального введения, могут быть в виде отдельных пластырей, адаптированных для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом субъекта в течение длительного периода времени. Композиции, пригодные для трансдермального введения также могут быть доставлены ионтофорезом (*см.*, например, Pharm. Res. 3:318 (1986)) и, как правило, принимают форму необязательно забуференного водного раствора композиции по настоящему изобретению. Подходящие композиции могут содержать цитрат или бис/трис буфер (pH 6) или этанол/воду и могут содержать от 0,1 до 0,2 М активного ингредиента.

Описанные в настоящем документе вирусные векторы можно вводить в легкие субъекта любыми подходящими способами, например, путем введения аэрозольной суспензии пригодных для вдыхания частиц, состоящих из вирусных векторов, которую субъект вдыхает. Пригодные для вдыхания частицы могут быть жидкими или твердыми. Аэрозоли из жидких частиц, содержащих вирусные векторы, могут быть получены любыми подходящими средствами, такими как аэрозольный распылитель, управляемый давлением, или ультразвуковой распылитель, как известно специалистам в данной области техники. *См.*, например, патент США №4,501,729. Аэрозоли из твердых частиц, содержащих вирусные векторы, также могут быть получены с помощью любого генератора аэрозолей лекарственного средства в виде твердых частиц с помощью методов, известных в фармацевтике.

Настоящее изобретение может быть таким, как определено в любом из следующих пронумерованных параграфов.

1. Полинуклеотид, содержащий открытую рамку считывания UBE3A человека, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую и длинную изоформу UBE3A человека.

2. Полинуклеотид по параграфу 1, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую изоформу UBE3A человека (*т.е.* изоформу 1) и длинную

изоформу 2.

3. Полипептид по пункту 1, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую изоформу UBE3A человека (*т.е.* изоформу 1) и длинную изоформу 3.

4. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-3, который содержит открытую рамку считывания UBE3A человека, содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии длинной изоформы по сравнению с экспрессией нативной ORF, в которой отсутствует одна или несколько нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии.

5. Полинуклеотид по п. 4, где экспрессия длинной изоформы снижена, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии.

6. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-5, где открытая рамка считывания UBE3A человека содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии короткой изоформы (*например*, повышения экспрессии на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) по сравнению с нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии.

7. Полинуклеотид по параграфу 6, где экспрессия короткой изоформы повышена, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии.

8. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-7, где открытая рамка считывания UBE3A человека содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для кодирования экспрессии короткой изоформы в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

9. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-8, который содержит первую последовательность Козака, содержащую SEQ ID NO: 6, функционально связанную с кодирующими последовательностями для длинной изоформы.

10. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-9, который содержит вторую последовательность Козака, содержащую SEQ ID NO: 8, функционально связанную с кодирующей последовательностью для короткой изоформы.

11. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-10, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке человека.

12. Полинуклеотид по параграфу 12, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодон-оптимизирована для внутриклеточной или не секреторной экспрессии в клетке человека.

13. Полинуклеотид по любому из параграфов 1-12, где открытая рамка считывания UBE3A человека содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 26, или нуклеотидную последовательность, на, по меньшей мере, примерно 70%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85% или 90% идентичную им.

14. Кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид по любому из параграфов 1-13.
15. Кассета экспрессии по параграфу 14, где открытая рамка считывания UBE3A человека функционально связана с промотором.
16. Кассета экспрессии по параграфу 15, где промотором является нейрон-специфический промотор.
17. Кассета экспрессии по параграфу 15 или 16, где промотором является промотор синапсина человека.
18. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-17, где открытая рамка считывания UBE3A человека функционально связана с сигналом полиаденилирования.
19. Кассета экспрессии по параграфу 18, где сигналом полиаденилирования является сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (bGHpA).
20. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-19, дополнительно содержащая, по меньшей мере, один инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).
21. Кассета экспрессии по параграфу 20, где кассета экспрессии содержит два AAV ITR.
22. Кассета экспрессии по параграфу 21, где AAV ITR выбраны из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13 ITR.
23. Кассета экспрессии по параграфу 22, где AAV ITR являются AAV2 ITR.
24. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-23, где кассетой экспрессии является одноцепочечный геном AAV.
25. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-24, где кассета экспрессии содержит промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека и сайт полиаденилирования.
26. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-25, где кассета экспрессии содержит AAV ITR, промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека, сайт полиаденилирования и AAV ITR.
27. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-26, где кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу 2 UBE3A человека, bGHpA и AAV2 ITR.
28. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-26, где кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу 3 UBE3A человека, bGHpA и AAV2 ITR.
29. Кассета экспрессии по любому из параграфов 14-28, где кассета экспрессии содержит AAV2 ITR; промотор синапсина человека; открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу и длинную изоформу 2 UBE3A человека,

дополнительно содержащую одну или несколько последовательностей Козака, содержащих, состоящих по существу из или состоящих из SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8; bGHPA; и ITR AAV2.

30. Кассета экспрессии по любому из пунктов 14-28, где кассета экспрессии содержит ITR AAV2; промотор синапсина человека; открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу и длинную изоформу 3 UBE3A человека, дополнительно содержащую одну или несколько последовательностей Козака, содержащих, состоящих по существу из или состоящих из SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8; bGHPA; и ITR AAV2.

31. Кассета экспрессии по параграфу 30, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей, по меньшей мере, примерно на 90%.

32. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из параграфов 1-13 или кассету экспрессии по любому из параграфов 14-31.

33. Вектор по параграфу 32, где вектором является нейротропный вектор.

34. Вектор по параграфу 32 или 33, где вектором является вирусный вектор.

35. Вектор по параграфу 34, где вектором является вектор AAV.

36. Вектор по параграфу 34, где вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 и их комбинаций.

37. Вектор по параграфу 35, где вектором AAV является вектор, полученный из AAV9 или AAV9.

38. Вектор по параграфу 37, где вектором, полученным из AAV9, является RNP.B, RNP.eB или AAV9.HR).

39. Трансформированная клетка, содержащая полинуклеотид по любому из параграфов 1-13, кассету экспрессии по любому из параграфов 14-31 и/или вектор по любому из параграфов 32-38.

40. Трансформированная клетка по п. 39, где полинуклеотид, кассета экспрессии и/или вектор стабильно включены в геном клетки.

41. Трансгенное животное, содержащее полинуклеотид по любому из параграфов 1-13, кассету экспрессии по любому из параграфов 14-31, вектор по любому из параграфов 32-38 и/или трансформированную клетку по параграфам 39 или 40.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид по любому из параграфов 1-13, кассету экспрессии по любому из параграфов 14-31, вектор по любому из параграфов 32-38 и/или трансформированную клетку по параграфам 39 или 40 в фармацевтически приемлемом носителе.

43. Способ экспрессии открытой рамки считывания UBE3A в клетке, включающий контакт клетки с полинуклеотидом по любому из параграфов 1-13, кассетой экспрессии по любому из параграфов 14-31 и/или вектором по любому из параграфов 32-38, тем самым вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A в клетке.

44. Способ экспрессии открытой рамки считывания UBE3A у субъекта, включающий доставку субъекту полинуклеотида по любому из параграфов 1-13, кассеты экспрессии по любому из параграфов 14-31, вектора по любому из параграфов 32-38, и/или трансформированной клетки по параграфу 39 или 40, тем самым вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A у субъекта.

45. Способ лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида по любому из параграфов 1-13, кассеты экспрессии по любому из параграфов 14-31, вектора по любому из параграфов 32-38 и/или трансформированной клетки по параграфу 39 или 40, так что открытая рамка считывания UBE3A экспрессируется в субъекте.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что нарушением, связанным с экспрессией гена UBE3A, является синдром Эйнджелмена.

47. Способ лечения синдрома Эйнджелмена у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида по любому из параграфов 1-13, кассеты экспрессии по любому из параграфов 14-31, вектора по любому из параграфов 32-38 и/или трансформированной клетки по параграфу 39 или 40, так что открытая рамка считывания UBE3A экспрессируется в субъекте.

48. Способ по любому из параграфов 43-47, где короткая изоформа UBE3A человека экспрессируется в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

49. Способ по любому из параграфов 44-48, где у субъекта проявляются симптомы заболевания до доставки полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки.

50. Способ по любому из параграфов 44-49, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют *in utero*.

51. Способ по любому из параграфов 44-50, где субъектом является человек.

52. Способ по любому из параграфов 44-51, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют в нервную систему субъекта.

53. Способ по любому из параграфов 44-52, где вектор AAV вводят субъекту в дозе, по меньшей мере, примерно 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} или 10^{16} вирусных геномов/килограмм, необязательно от 10^8 - 10^{14} вирусных геномов/килограмм.

54. Способ по параграфу 52, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют внутривенно.

55. Способ по параграфу 52, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интратекальной, интрацеребральной,

интрамостомозжечной, интрапаренхимальной, интрацеребровентрикулярной, интраназальной, интраауральной, внутриглазной или периокулярной доставкой или любой их комбинацией.

56. Способ по параграфу 55, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интратекально.

57. Способ по параграфу 55, где полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интрацеребровентрикулярно.

После описания настоящего изобретения оно будет объяснено более подробно в следующих примерах, которые включены сюда только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание кодон-оптимизированной конструкции UBE3A человека для внутриклеточной экспрессии.

Разработана новая терапия синдрома Эйнджелмена, которая обеспечивает совместную доставку как коротких, так и длинных изоформ UBE3A (*например*, изоформ 1 (также известных как «короткие») и 3 (также известных как «длинные») человека) при соответствующем соотношении экспрессии, названных в настоящем документе RNP.B/SYN-UBE3A, включающих открытую рамку считывания (ORF) hUBE3A_Isoform1>>3. Это значительное техническое преимущество, поскольку пределы упаковки вирусного вектора обычно допускают экспрессию только одной изоформы. Эта конструкция решает две основные проблемы: (1) доставки UBE3A по всему мозгу; и (2) предотвращения сверхэкспрессии UBE3A, которая может быть связана с синдромной формой аутизма (синдром Dup15q). Капсиды, полученные из AAV9, при доставке в раннем возрасте могут широко трансдуцировать нейроны по всему мозгу. Хотя существуют и другие капсиды AAV, которые могут способствовать еще более широкому переносу генов в мозг приматов, отличных от человека, и людей, капсиды, полученные из AAV9, выбирают с учетом ограничения сверхэкспрессии UBE3A.

Кроме того, эту конструкцию создают для экспрессии внутриклеточного (*например*, цитоплазматического и/или ядерного) UBE3A, и она отличается от некоторых работ, выполняемых в других лабораториях, тем, что не содержит экзогенно добавленного секреторного сигнала, тем самым предотвращая внеклеточную экспрессию и образование секреторируемой формы UBE3A. Не желая быть связанными теорией, считается, что такое конструирование UBE3A, приводящее к секретированному UBE3A, устранил способность регулировать соответствующие уровни экспрессии UBE3A, что может привести к опасной сверхэкспрессии. Сверхэкспрессия UBE3A может быть связана с синдромом Dup15q, синдромной формой аутизма. Секретированный UBE3A может также терять регуляцию специфичности клеточного типа или биораспределения экспрессии UBE3A, а также иметь измененные посттрансляционные модификации и/или измененное и/или расширенное взаимодействие с субстратом для его лигазной активности. В этом отношении считается, что продукт UBE3A, полученный из описанных в настоящем документе конструкций, дает

лучшие результаты, чем сообщалось ранее.

На **ФИГ. 3В** показана схема 5' последовательности ДНК вектора, оптимизированной по Козаку (SEQ ID NO: 20) (вверху) и белковой (SEQ ID NO: 21) (внизу), кодон-оптимизированной открытой рамки считывания hUBE3A1>>3 для конструирования вектора для достижения смещенной экспрессии короткой изоформы UBE3A человека (hUBE3A). И длинный, и короткий hUBE3A кодированы в одной и той же рамке считывания. Последовательности Козака разной силы были сконструированы для смещения инициации трансляции со второго старт-кодона (AGCAGGATGA; SEQ ID NO: 25), начинающего короткую изоформу hUBE3A (**ФИГ. 3В** и **ФИГ. 3С**).

Свойства экспрессии конструкции исследуют на модели AS у мышей (Ube3a^{m-/p+}), где мыши демонстрируют полную потерю всех изоформ UBE3A в нейронах (**ФИГ. 4**; Jiang et al., Neuron, 1998;21(4):799-811). Новорожденным мышам интрацеребровентрикулярно (ICV) вводят инъекцию примерно 1×10^{11} вирусных геномов (vg) полученного из AAV9 варианта вирусного вектора PHP.B/SYN-hUBE3A в день после рождения P1 и собирают в различные моменты времени для дополнительных анализов экспрессии мРНК и белка. На **ФИГ. 5** показано, что транскрипты hUBE3A, экспрессированные конструкцией, могут быть выборочно обнаружены среди эндогенных мРНК у леченного субъекта благодаря наличию уникальных нуклеотидных последовательностей, введенных через оптимизацию кодонов. Этот аспект дизайна конструкции можно использовать для точного отслеживания биораспределения PHP.B/SYN-hUBE3A и тем самым облегчить оптимизацию стратегий биодоставки у мышей, приматов, отличных от человека, и, в конечном итоге, у людей. Транскрипты hUBE3A, кодированные конструкцией, оказались способными экспрессировать как короткие, так и длинные изоформы белка hUBE3A, как показано в эксперименте вестерн-блоттинга на **ФИГ. 6**. Важно отметить, что соотношение коротких и длинных hUBE3A составляет 3:1, что приблизительно соответствует соотношению 4:1, ранее наблюдавшемуся для эндогенных изоформ UBE3A мыши (Avagliano et al., Nat Neurosci, 2019;22(8):1235-1247), и является демонстрацией осуществимости дизайна конструкции для достижения желаемых соотношений изоформ hUBE3A через манипулирование силой последовательности Козака.

ФИГ. 7А демонстрирует успешную доставку продуктов hUBE3A_Isoform1>>3 новорожденным мышам с AS моделью, о чем свидетельствует иммуногистохимия (ИНС) UBE3A, выполненная в дни после рождения P10, P15 и P25. При более тщательном изучении структур мозга, совместное окрашивание UBE3A и нейронального маркера NeuN показало почти полную колокализацию, что указывает на высокоэффективную трансдукцию нейронов с помощью PHP.B/SYN-UBE3A (**ФИГ. 7В**). Белок UBE3A показывает выраженную ядерную локализацию, соответствующую доминантной экспрессии короткой изоформы hUBE3A. Стрелки указывают на редкие нейроны гиппокампа, в которых UBE3A не был повторно экспрессирован, что указывает на то, что большинство нейронов коры и гиппокампа экспрессируют продукты

hUBE3A_Isoform1>>3.

Качественные оценки показывают эффективное повторное введение изоформ UBE3A в развивающийся мозг (**ФИГ. 8, панели A-F**) на соответствующих уровнях и в соответствии с эндогенными профилями субклеточной локализации, где hUBE3A демонстрирует переход от цитоплазмы к ядру в субклеточной локализации после переноса гена. **ФИГ. 8, панели A-C** показывают окрашенный UBE3A слой 2/3 неокортекса из модели AS у мышей на P10 (**панель A**), P15 (**панель B**) и P25 (**панель C**) после ICV инъекции вируса RNP.B/hUBE3A на P1. Постепенное накопление вирусно трансдуцированного hUBE3A в ядре наблюдается по мере развития, точное повторение пространственно-временных профилей эндогенной экспрессии UBE3A, как показано на **панелях D-F** из Judson et al., J Comparative Neurology, 2014:522(8):1874-1896.

Пример 2: Обработка кодон-оптимизированной конструкции UBE3A человека для восстановления анатомических и поведенческих фенотипов в модели AS у мышей.

ФИГ. 9 показывает, что RNP.B/hUBE3A в целом хорошо переносится мышами WT и с моделью AS, о чем свидетельствует масса тела, которая эквивалентна в группах, получавших генную терапию (WT+AAV и AS+AAV), и WT контролях, получавших носитель (WT+Носитель) в возрасте одного месяца. Мыши с AS, получавшие носитель, чрезмерно набирают вес в зрелом возрасте, что согласуется как с предыдущими сообщениями (Judson et al., J Neurosci, 2017:37(31):7347-7361), так и с клиническими наблюдениями ожирения у взрослых людей с AS (Bindels-de Heus et al., Am J Med Genet A, 2020:182(1):53-63). Этот фенотип был полностью сохранен обработкой RNP.B/hUBE3A в группе AS+AAV.

Продолжают дальнейшее тестирование способности ICV лечения RNP.B/hUBE3A новорожденных для воспроизведения высокой пенетрантности и воспроизводимости дефицита модели AS у мышей (**ФИГ. 10, панель A**; Rotaru et al., Neuroscience, 2020:Epub, ожидает печати). **ФИГ. 10, панель B** демонстрирует тенденцию к гиполокомоции у мышей AS+Носитель, на которых не повлияло лечение генной терапией. AS+Носитель и AS+AAV демонстрируют одинаково низкую эффективность в первом испытании задачи с вращающимся барабаном, что позволяет предположить, что определенный уровень двигательной дисфункции при AS может быть невосприимчивым к лечению ICV RNP.B/hUBE3A новорожденных. Однако повторное тестирование на вращающемся барабане выявило восстановленную способность к двигательному обучению и пластичность у мышей AS+AAV, что повысило двигательные характеристики по сравнению с последовательными опытно-методическими исследованиями и поддерживало их около контрольных уровней с течением времени (**ФИГ. 10, панель C**).

Известно, что врожденное поведение, в том числе копание и строительство гнезда, у мышей с AS сильно нарушено (Rotaru et al., Neuroscience, 2020:Epub ожидает печати). **ФИГ. 10, панели D и E** показывают, что эти фенотипы воспроизводятся у мышей AS+Носитель, о чем свидетельствует их низкая эффективность по сравнению с

контролями WT+Носитель в хорошо зарекомендовавших себя анализах закапывания шариков и строительства гнезд. Пенетрантность этих фенотипов была значительно снижена в группе AS+AAV, при этом многие индивидуальные субъекты выполняли задачи на контрольном уровне. Тем не менее, была небольшая подгруппа плохих респондеров AS+AAV, которые были особенно заметны при распространении данных о закапывании шариков. Эти результаты требуют тщательного *post hoc* анализа биораспределения hUBE3A, чтобы гарантировать, что истинная эффективность лечения не недооценена из-за технических ошибок - плохого таргетирования или распространения инъекции - которые искажают измерения поведенческого восстановления.

ФИГ. 11 демонстрирует доказательства тяжелого эпилептогенеза у мышей AS+Носитель, который был выявлен в результате флуротилового киндлинга приступов и провокационной пробы. Этот результат согласуется с выводами предыдущего исследования (Gu et al., J Clin Invest, 2018:129(1):163-168), в котором мыши AS показали аналогичную повышенную чувствительность к повторному воздействию флуротила через месяц после киндлинга. Более того, преувеличенный эпилептогенез у мышей AS можно было восстановить посредством индуцируемого тамоксифеном восстановления UBE3A во время послеродового развития, и, соответственно, обработка новорожденных ICV PNP.B/hUBE3A сделала мышей AS+AAV устойчивыми к провокационной пробе флуротила (**ФИГ. 11, панель В**).

Анатомические и физиологические изменения в мозговых цепях определяют эпилептогенез. Спровоцированные флуротилом мыши AS демонстрируют повышенное отложение перинейрональных сетей (PNN) в гиппокампе, особенно в молекулярном слое зубчатой извилины (Gu et al., J Clin Invest, 2018:129(1):163-168). **ФИГ. 12, панель А** показывает, что этот aberrантный фенотип PNN также был пенетрантным у мышей AS+Носитель, но полностью восстановился у мышей AS+AAV. Реактивный астроглиоз является еще одной отличительной чертой эпилептогенных очагов. **ФИГ. 12, панель В** показывает, что имело место резкое увеличение интенсивно окрашенных GFAP астроцитов в гиппокампе мышей AS+носитель, что оказалось полностью нормализованным в группе AS+AAV. В совокупности эти исследования предоставляют подтверждающие доказательства того, что лечение новорожденных ICV PNP.B/hUBE3A может быть высокоэффективным в улучшении исходов судорог при AS.

В этих исследованиях мыши WT+AAV служат *de facto* тестом на переносимость сверхэкспрессии UBE3A. В большинстве случаев эффективность групп WT+AAV и WT+носитель была аналогичной, что позволяет предположить, что сверхэкспрессия UBE3A в результате лечения PNP.B/hUBE3A относительно хорошо переносится. Однако мыши WT+AAV действительно оказались умеренно гиперлокомотивными (**ФИГ. 10, панель В**), и они несколько хуже справились с задачей закапывания шариков (**ФИГ. 10, панель D**). Таким образом, определенное поведение и лежащие в его основе нейронные цепи потенциально могут быть более уязвимыми, чем другие, для сверхэкспрессии UBE3A.

Пример 3. Обработка конструкции в клетках, полученных у человека, *in vitro* и *in vivo*.

Конструкцию, описанную в примере 1, доставляют *in vitro* в iPSC, полученные от пациента, которые были дифференцированы в нейроны и которые проявляют клеточные фенотипы AS. Затем в реципиентных клетках наблюдают изменения характеристических клеточных фенотипов AS по сравнению с соответствующей контрольной клеткой, которая не получила конструкцию.

Линии AS iPSC получают из периферических клеток кожи или крови пациента, плюрипотентность которым придают ретровирусные или лентивирусные векторы, экспрессирующие ключевые факторы транскрипции OCT4, SOX2, KLF4, MYC и LIN28 (Takahashi et al., Cell, 2007: 131: 861-872; Sommer et al., Stem Cells, 2008: 27: 543-549). В некоторых препаратах, редактирование CRISPR/Cas9 может использоваться для введения AS-вызывающих делеций UBE3A в iPSC, полученных от нейротипичных пациентов, что дает новые линии iPSC AS с сопутствующими изогенными контролями. iPSC AS можно дифференцировать в нейроны с помощью среды для нейронной индукции, содержащей добавки и факторы роста нервов, в соответствии с установленными протоколами (Chamberlain et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2010: 107: 17668-17673).

Было показано, что нейроны AS, полученные от пациентов, демонстрируют характерно замедленное созревание электрофизиологических свойств, включая гиперполяризацию мембранного потенциала покоя и возбуждения потенциала действия, что поддается устранению путем отключения отцовского UBE3A фармакологическими агентами (Fink et al., Nat. Comm., 2017: Apr 24;8:15038). Аналогично, конструкцию доставляют к полученным от пациента нейронам AS (*in vitro* и *in vivo*) для восстановления экспрессии hUBE3A и корректировки задержек в электрофизиологическом созревании. Для подтверждения концепции лечения приматов, не относящихся к человеку, и людей конструкцию доставляют на ранних этапах вмешательства (например, в возрасте до 2 лет) у 1-3 пациентов с увеличением дозы по мере необходимости в зависимости от исследований безопасности и эффективности. Оценивают клиническую пользу и безопасность (например, по сравнению с соответствующими контролями).

Вышеупомянутые примеры иллюстрируют настоящее изобретение и не должны рассматриваться как его ограничение. Хотя изобретение было подробно описано со ссылкой на предпочтительные варианты осуществления, существуют вариации и модификации в пределах объема и сущности изобретения, как описано и определено в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, содержащий открытую рамку считывания UBE3A человека, где открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую и длинную изоформу UBE3A человека.

2. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую изоформу (*т.е.* изоформу 1) и длинную изоформу 2 UBE3A человека.

3. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека кодирует короткую изоформу (*т.е.* изоформу 1) и длинную изоформу 3 UBE3A человека.

4. Полинуклеотид по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии длинной изоформы по сравнению с экспрессией нативной ORF, в которой отсутствует одна или несколько нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии.

5. Полинуклеотид по п. 4, который включает экспрессию длинной изоформы, сниженную, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, по сравнению с нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для снижения экспрессии.

6. Полинуклеотид по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии короткой изоформы (*например*, повышения экспрессии на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) по сравнению с нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии.

7. Полинуклеотид по п. 6, отличающийся тем, что экспрессия короткой изоформы повышена, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с к нативной ORF, не содержащей нуклеотидных модификаций для усиления экспрессии.

8. Полинуклеотид по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека содержит одну или несколько нуклеотидных модификаций для кодирования экспрессии короткой изоформы в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

9. Полинуклеотид по любому из пп. 1-8, который содержит первую последовательность Козака, содержащую SEQ ID NO: 6, функционально связанную с кодирующими последовательностями для длинной изоформы.

10. Полинуклеотид по любому из пп. 1-9, который содержит вторую последовательность Козака, содержащую SEQ ID NO: 8, функционально связанную с кодирующей последовательностью для короткой изоформы.

11. Полинуклеотид по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке человека.

12. Полинуклеотид по п. 12, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека кодон-оптимизирована для внутриклеточной или не секреторной экспрессии в клетке человека.

13. Полинуклеотид по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, или нуклеотидную последовательность, на, по меньшей мере, примерно 70%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85% или 90% идентичную им.

14. Кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-13.

15. Кассета экспрессии по п. 14, отличающаяся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека функционально связана с промотором.

16. Кассета экспрессии по п. 15, отличающаяся тем, что промотором является нейрон-специфический промотор.

17. Кассета экспрессии по п. 15 или 16, отличающаяся тем, что промотором является промотор синапсина человека.

18. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-17, отличающаяся тем, что открытая рамка считывания UBE3A человека функционально связана с сигналом полиаденилирования.

19. Кассета экспрессии по п. 18, отличающаяся тем, что сигналом полиаденилирования является сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (bGHpA).

20. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-19, дополнительно содержащая, по меньшей мере, один инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

21. Кассета экспрессии по п. 20, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит два AAV ITR.

22. Кассета экспрессии по п. 21, отличающаяся тем, что AAV ITR выбраны из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13 ITR.

23. Кассета экспрессии по п. 22, отличающаяся тем, что AAV ITR являются AAV2 ITR.

24. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-23, отличающаяся тем, что кассетой экспрессии является одноцепочечный геном AAV.

25. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-24, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека и сайт полиаденилирования.

26. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-25, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит AAV ITR, промотор, открытую рамку считывания UBE3A человека, сайт полиаденилирования и AAV ITR.

27. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-26, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку

считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу 2 UBE3A человека, bGHpA и AAV2 ITR.

28. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-26, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит AAV2 ITR, промотор синапсина человека, открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую и длинную изоформу 3 UBE3A человека, bGHpA и AAV2 ITR.

29. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-28, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит AAV2 ITR; промотор синапсина человека; открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу и длинную изоформу 2 UBE3A человека, дополнительно содержащую одну или несколько последовательностей Козака, содержащих, по существу состоящих из или состоящих из SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8; bGHpA; и ITR AAV2.

30. Кассета экспрессии по любому из пп. 14-28, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит AAV2 ITR; промотор синапсина человека; открытую рамку считывания UBE3A человека, содержащую короткую изоформу и длинную изоформу 3 UBE3A человека, дополнительно содержащую одну или несколько последовательностей Козака, содержащих, состоящих по существу из или состоящих из SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8; bGHpA; и ITR AAV2.

31. Кассета экспрессии по п. 30, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей, по меньшей мере, примерно на 90%.

32. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-13 или кассету экспрессии по любому из пп. 14-31.

33. Вектор по п. 32, отличающийся тем, что вектором является нейротропный вектор.

34. Вектор по п. 32 или 33, отличающийся тем, что вектором является вирусный вектор.

35. Вектор по п. 34, отличающийся тем, что вектором является вектор AAV.

36. Вектор по п. 35, отличающийся тем, что вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 и их комбинаций.

37. Вектор по п. 35, отличающийся тем, что вектором AAV является вектор, полученный из AAV9 или AAV9.

38. Вектор по п. 37, отличающийся тем, что вектором, полученным AAV9, является PHP.B, PHP.eB или AAV9.HR).

39. Трансформированная клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-13, кассету экспрессии по любому из пп. 14-31 и/или вектор по любому из пп. 32-38.

40. Трансформированная клетка по п. 39, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кассета экспрессии и/или вектор стабильно включены в геном клетки.

41. Трансгенное животное, содержащее полинуклеотид по любому из пп. 1-13,

кассету экспрессии по любому из пп. 14-31, вектор по любому из пп. 32-38 и/или трансформированную клетку по пп. 39 или 40.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-13, кассету экспрессии по любому из пп. 14-31, вектор по любому из пп. 32-38 и/или трансформированную клетку по пп. 39 или 40 в фармацевтически приемлемом носителе.

43. Способ экспрессии открытой рамки считывания UBE3A в клетке, включающий контакт клетки с полинуклеотидом по любому из пп. 1-13, кассетой экспрессии по любому из пп. 14-31 и/или вектором по любому из пп. 32-38, тем самым вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A в клетке.

44. Способ экспрессии открытой рамки считывания UBE3A у субъекта, включающий доставку субъекту полинуклеотида по любому из пп. 1-13, кассеты экспрессии по любому из пп. 14-31, вектора по любому из пп. 32-38, и/или трансформированной клетки по п. 39 или 40, тем самым вызывая экспрессию открытой рамки считывания UBE3A у субъекта.

45. Способ лечения нарушения, связанного с aberrантной экспрессией гена UBE3A или aberrантной активностью продукта гена UBE3A у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида по любому из пп. 1-13, кассеты экспрессии по любому из пп. 14-31, вектора по любому из пп. 32-38 и/или трансформированной клетки по п. 39 или 40, так что открытая рамка считывания UBE3A экспрессируется в субъекте.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что нарушением, связанным с экспрессией гена UBE3A, является синдром Эйнджелмена.

47. Способ лечения синдрома Эйнджелмена у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотида по любому из пп. 1-13, кассеты экспрессии по любому из пп. 14-31, вектора по любому из пп. 32-38, и/или трансформированной клетки по п. 39 или 40, так что открытая рамка считывания UBE3A экспрессируется у субъекта.

48. Способ по любому из пп. 43-47, отличающийся тем, что короткая изоформа UBE3A человека экспрессируется в соотношении от примерно 1:1 до примерно 15:1 по сравнению с экспрессией длинной изоформы.

49. Способ по любому из пп. 44-48, отличающийся тем, что у субъекта проявляются симптомы заболевания до доставки полинуклеотида, кассеты экспрессии, вектора и/или трансформированной клетки.

50. Способ по любому из пп. 44-49, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют *in utero*.

51. Способ по любому из пп. 44-50, отличающийся тем, что субъектом является человек.

52. Способ по любому из пп. 44-51, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют в нервную систему субъекта.

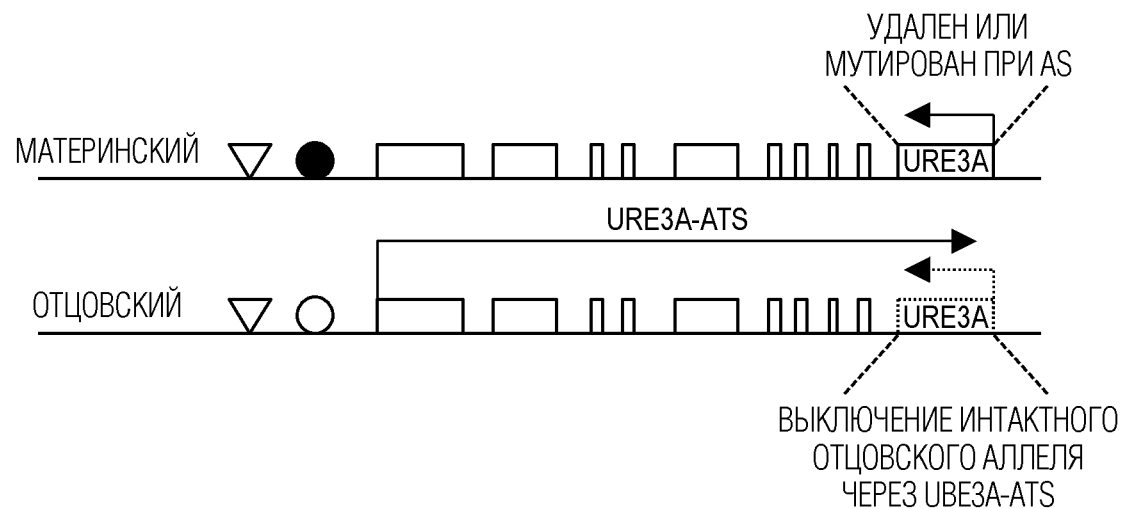
53. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что вектор AAV вводят субъекту в дозе, по меньшей мере, примерно 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} или 10^{16} вирусных геномов/килограмм, необязательно от 10^8 - 10^{14} вирусных геномов/килограмм.

54. Способ по п. 52, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют внутривенно.

55. Способ по п. 52, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интратекальной, интрацеребральной, интрамостомозжечковой, интрапаренхимальной, интрацеребровентрикулярной, интраназальной, интраауральной, внутриглазной или периокулярной доставкой или любой их комбинацией.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интратекально.

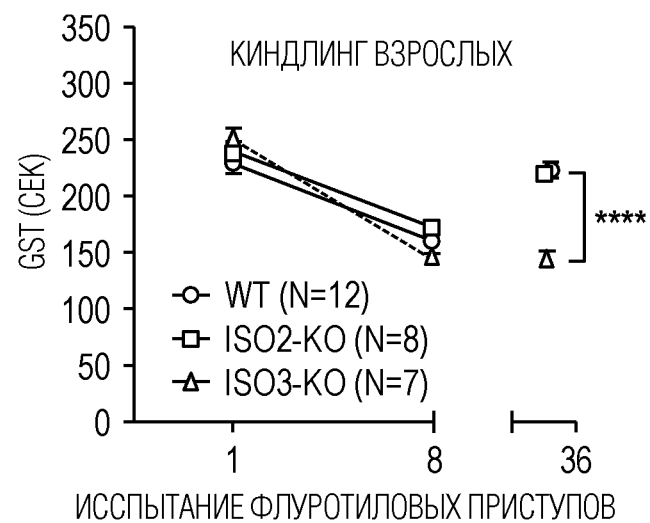
57. Способ по п. 55, отличающийся тем, что полинуклеотид, кассету экспрессии, вектор и/или трансформированную клетку доставляют интрацеребровентрикулярно.



ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

ИЗОФОРМЫ UBE3A ЧЕЛОВЕКА

КОРОТКАЯ – 1 MKRAAAKHLLIERYYHQLTEGCGNEACTNEFCASC

ДЛИННАЯ – { 2 MEKLNHCYWKSGEPQSDDIEASRMKRAAAKHLLIERYYHQLTEGCGNEACTNEFCASC

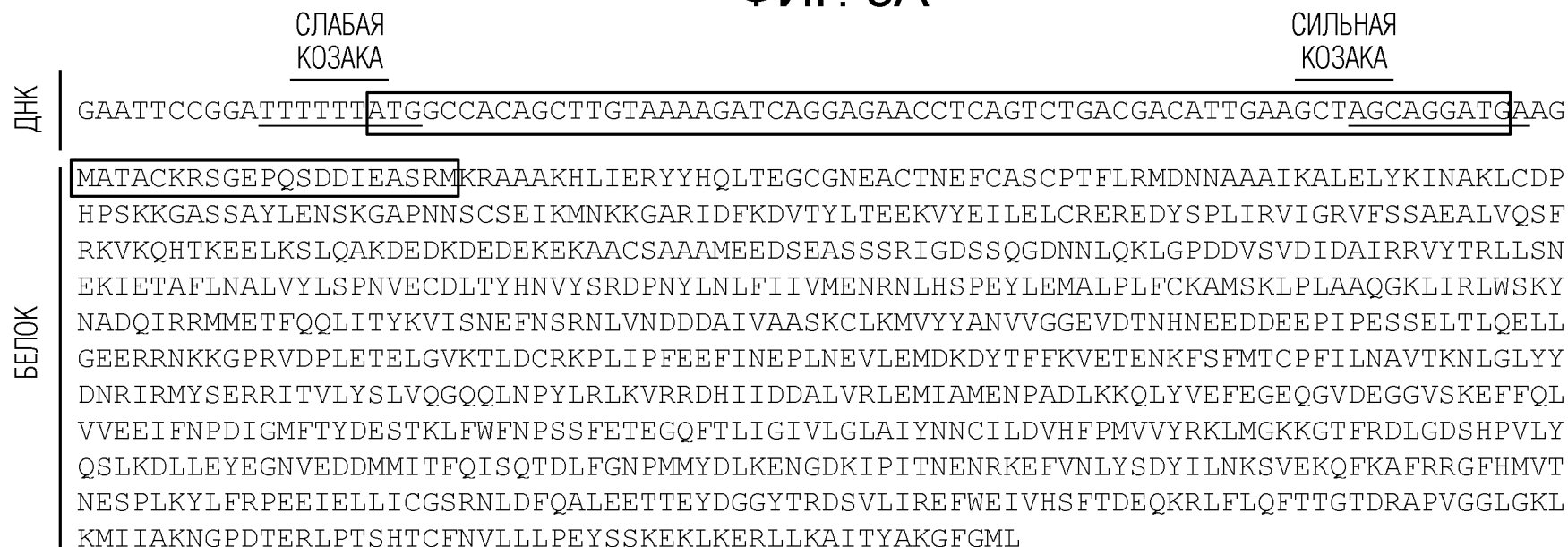
3 MATAACKRSGEPQSDDIEASRMKRAAAKHLLIERYYHQLTEGCGNEACTNEFCASC

ИЗОФОРМЫ UBE3A МЫШИ

ДЛИННАЯ – 2 MATAACKRSPGESQSEDIASRMKRAAAKHLLIERYYHQLTEGCGNEACTNEFCASC

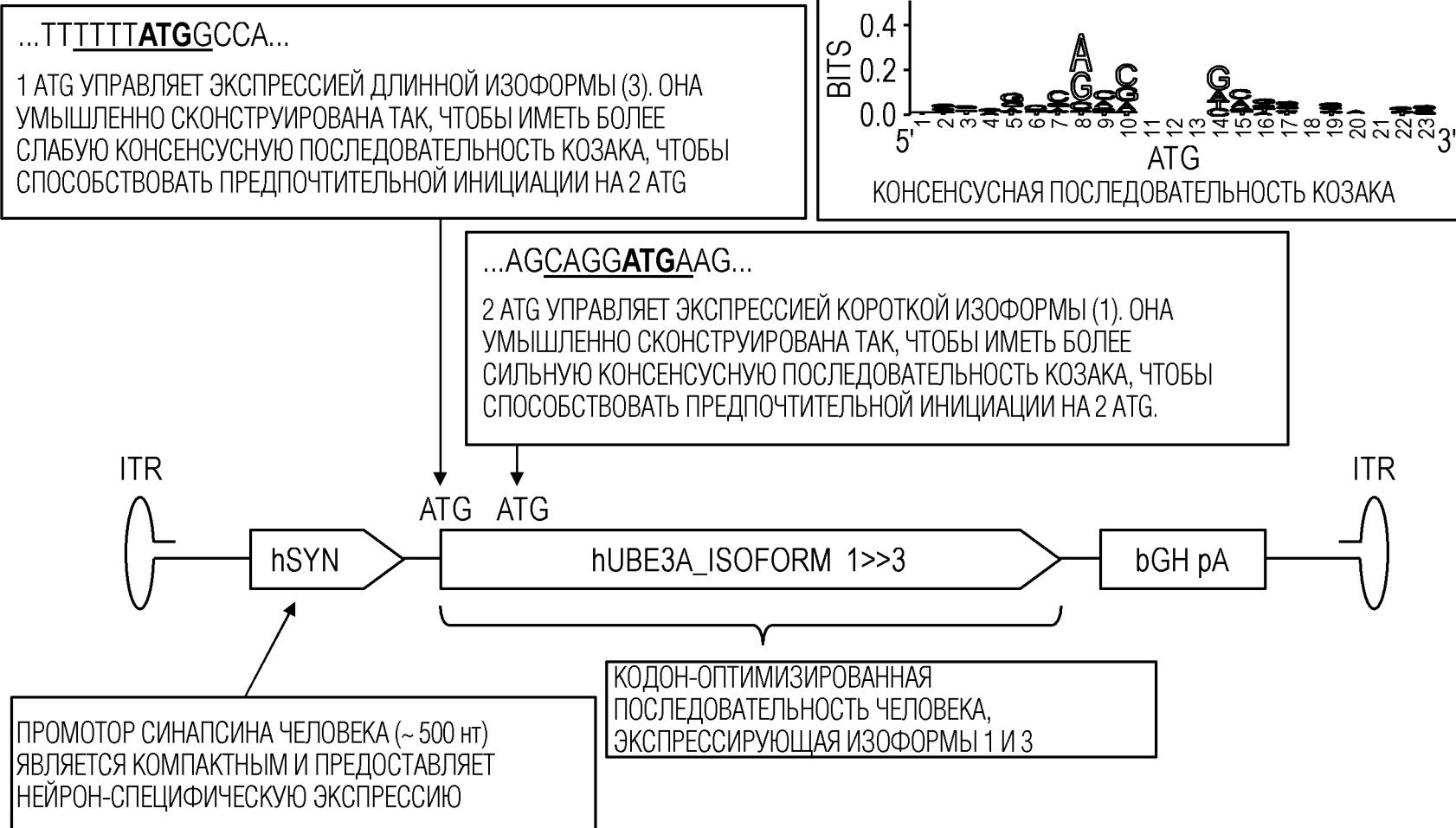
КОРОТКАЯ – 3 MKRAAAKHLLIERYYHQLTEGCGNEACTNEFCASC

ФИГ. 3А

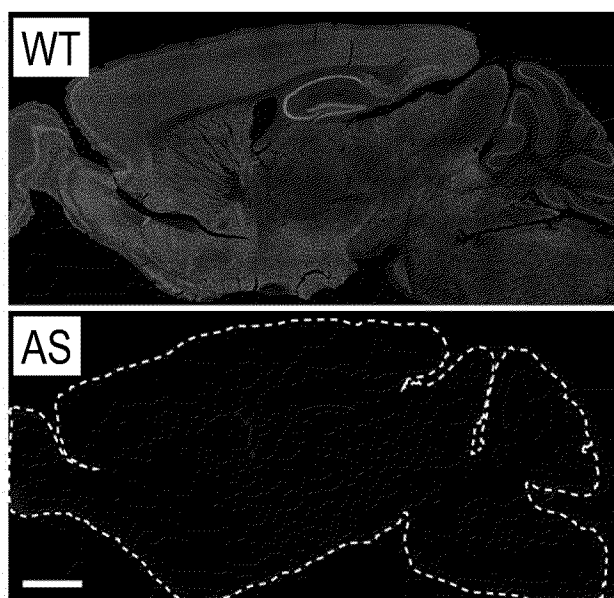


ФИГ. 3В

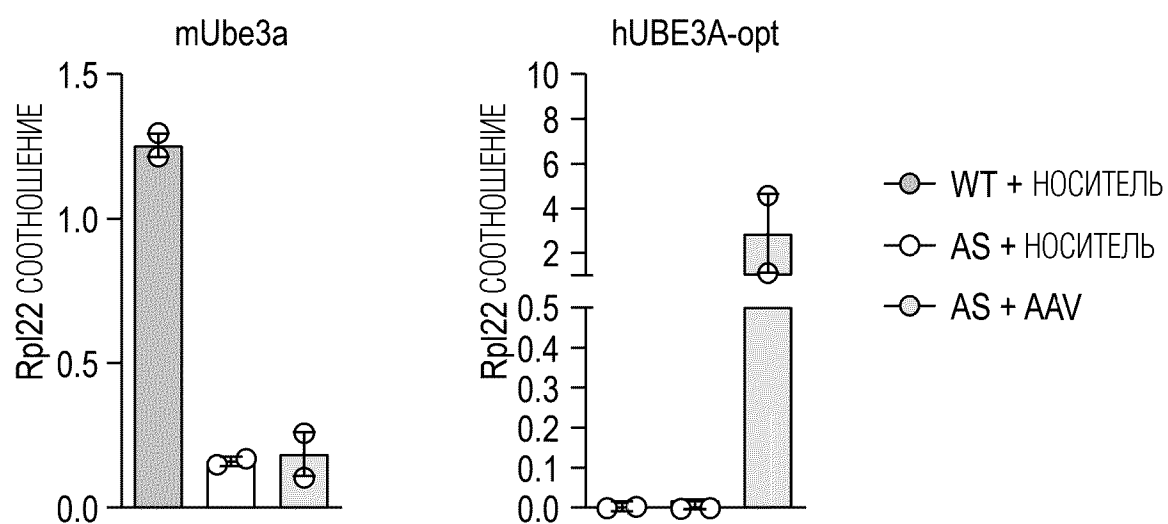
ДИЗАЙН КАССЕТЫ UBE3A



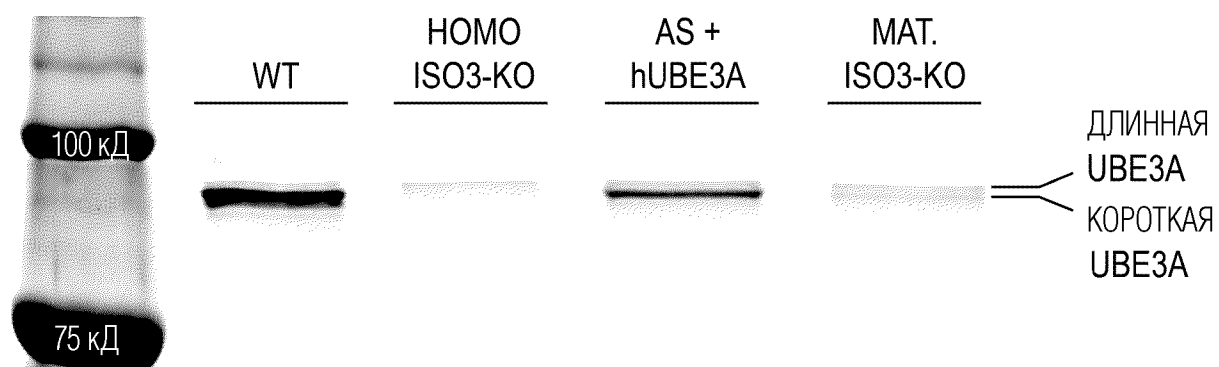
ФИГ. 3С



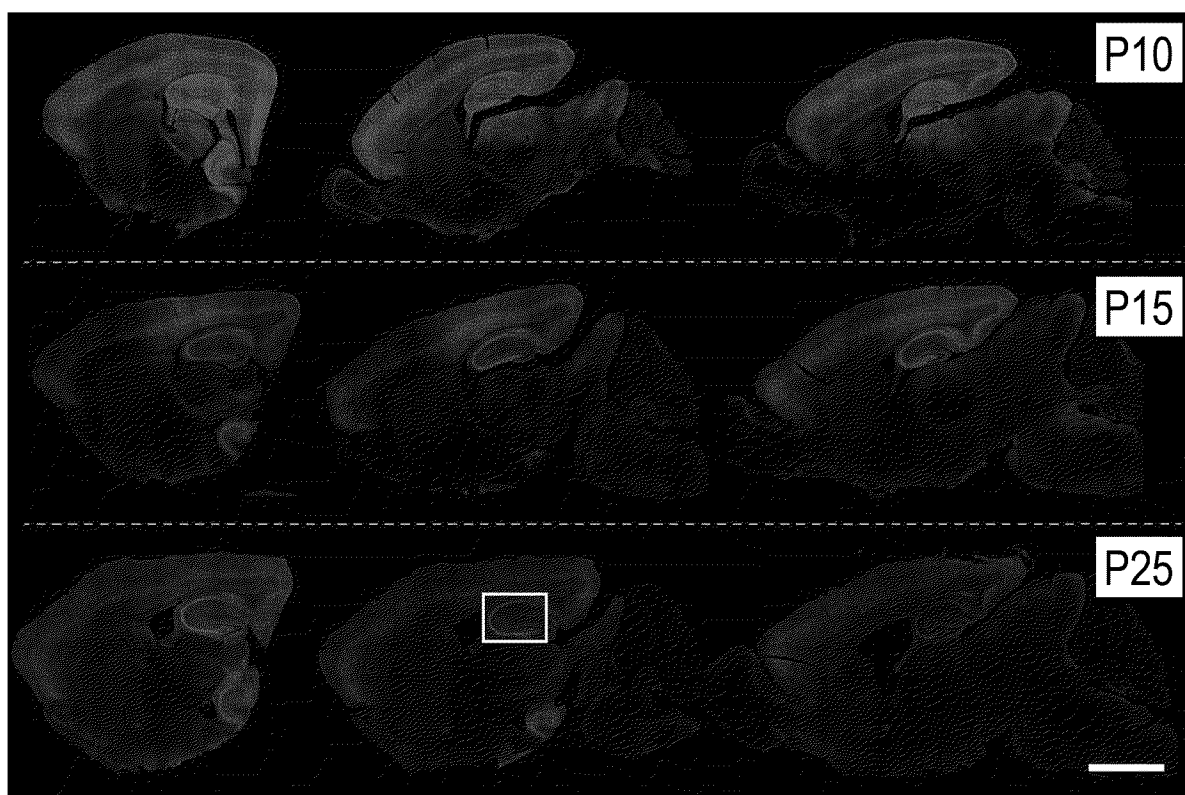
ФИГ. 4



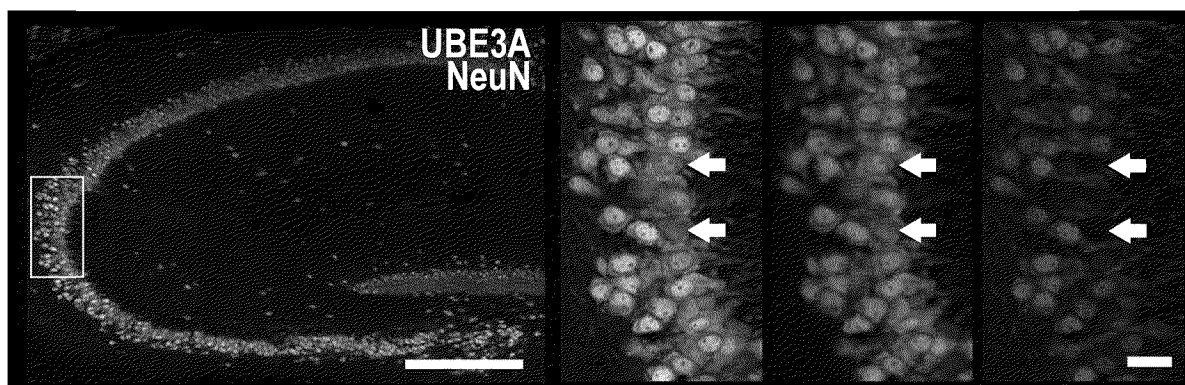
ФИГ. 5



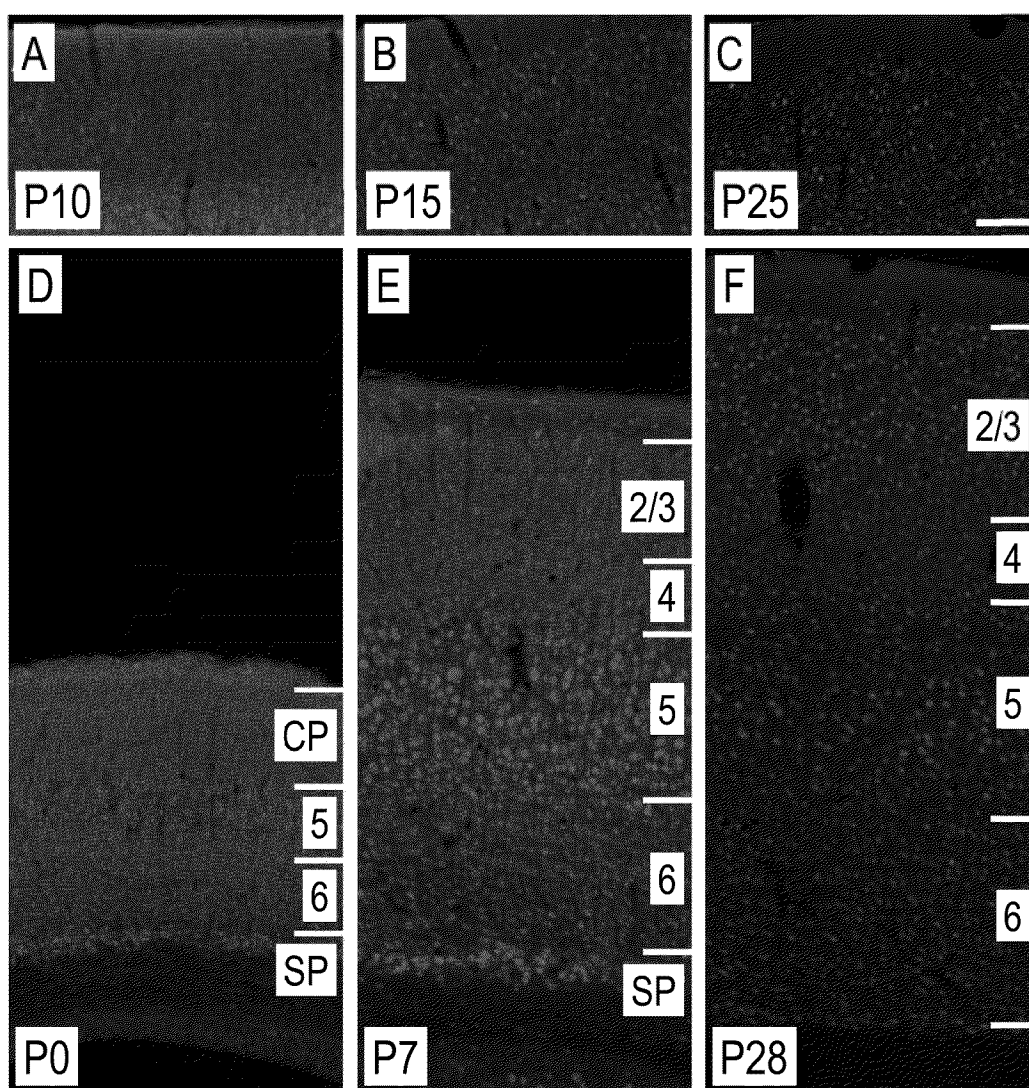
ФИГ. 6



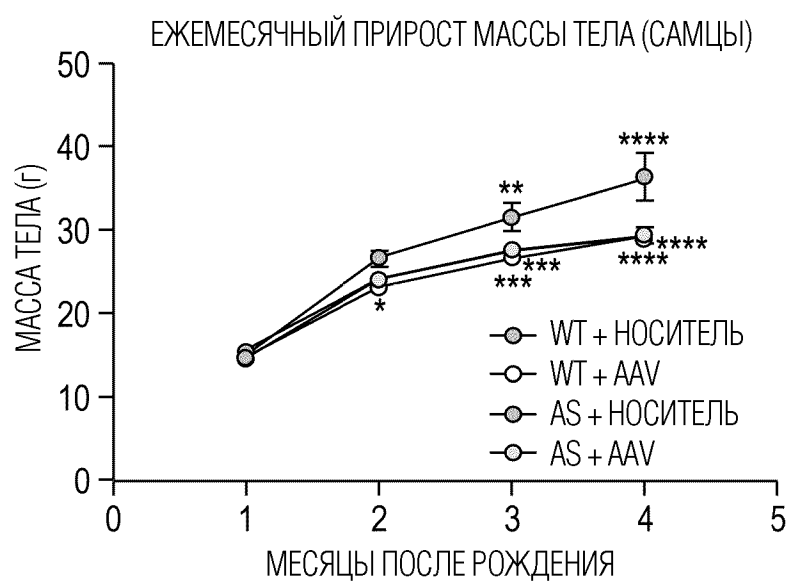
ФИГ. 7А



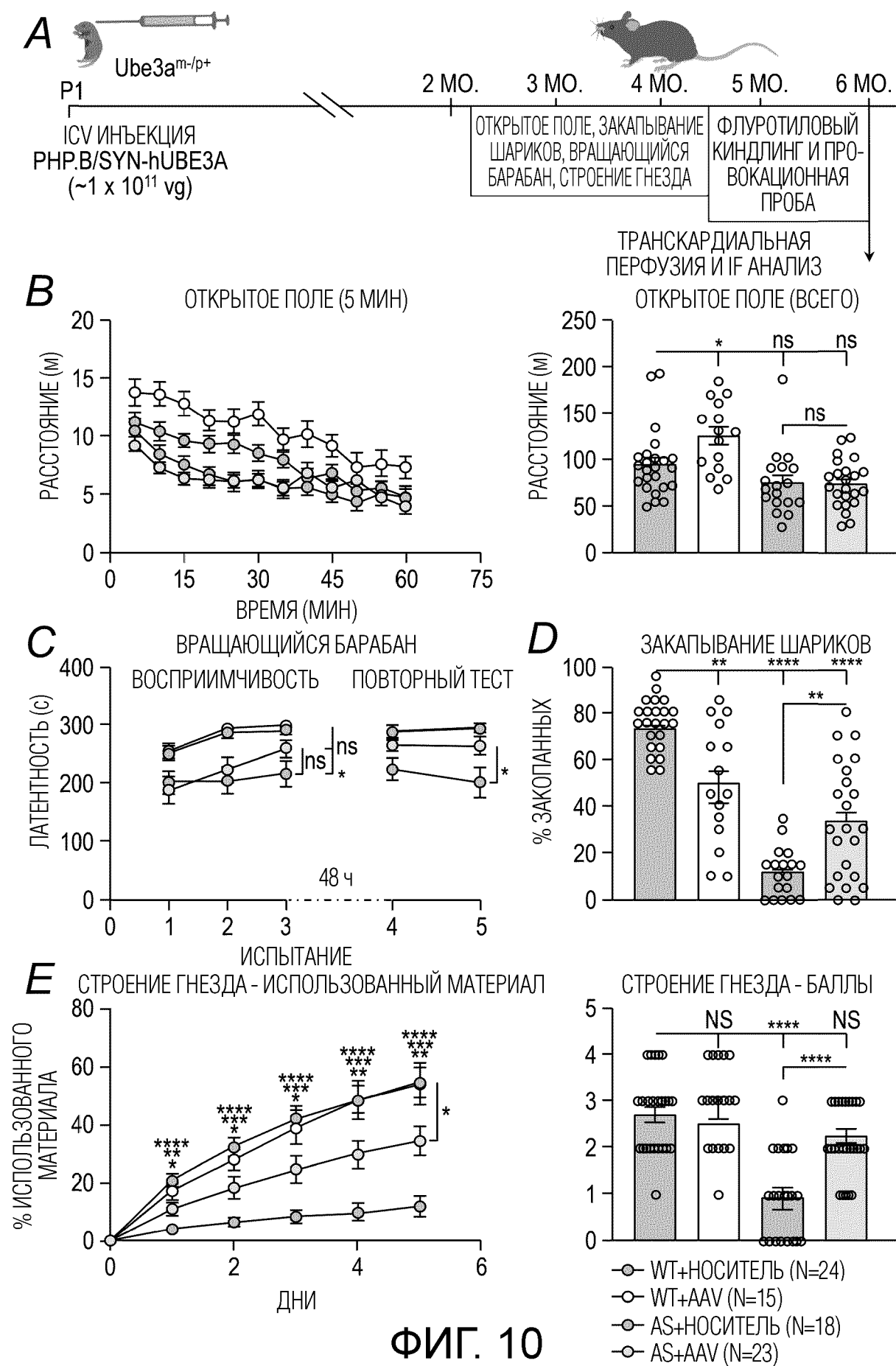
ФИГ. 7В



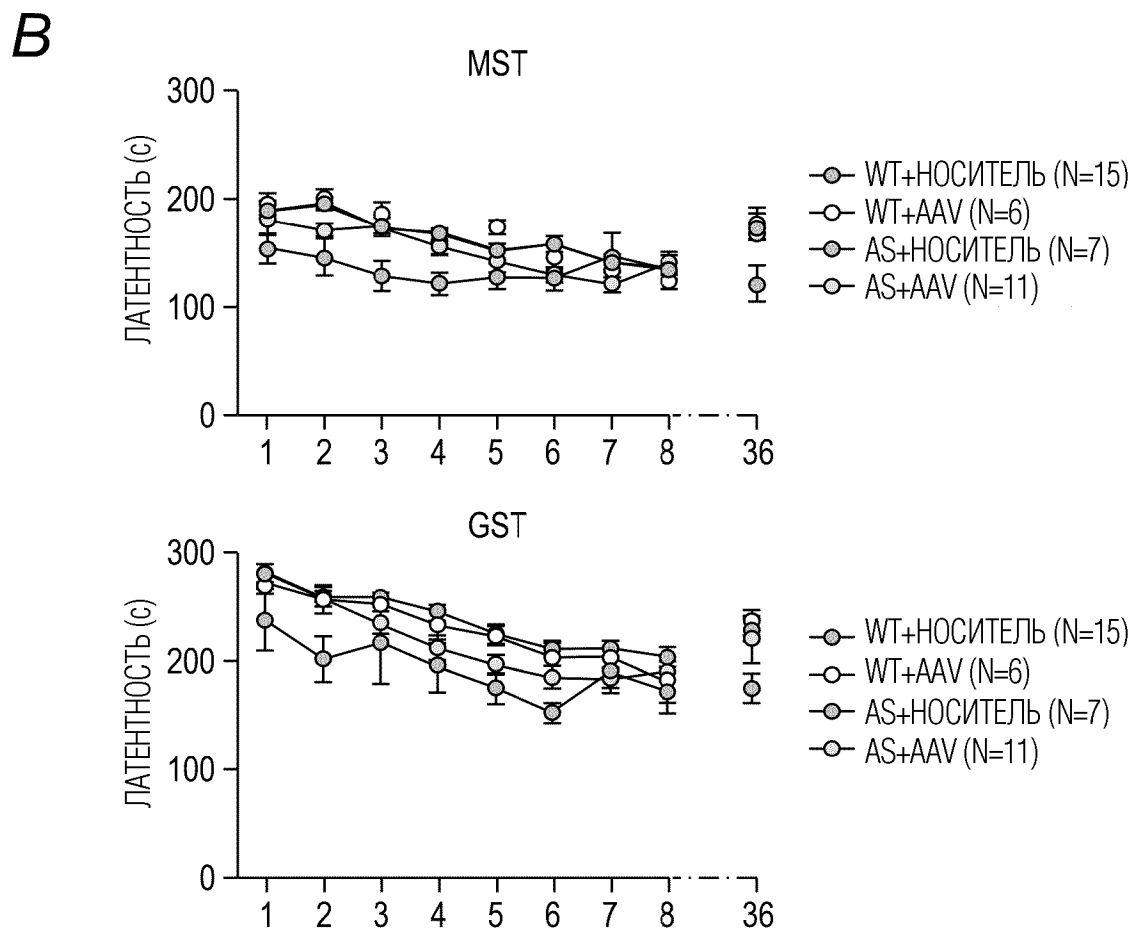
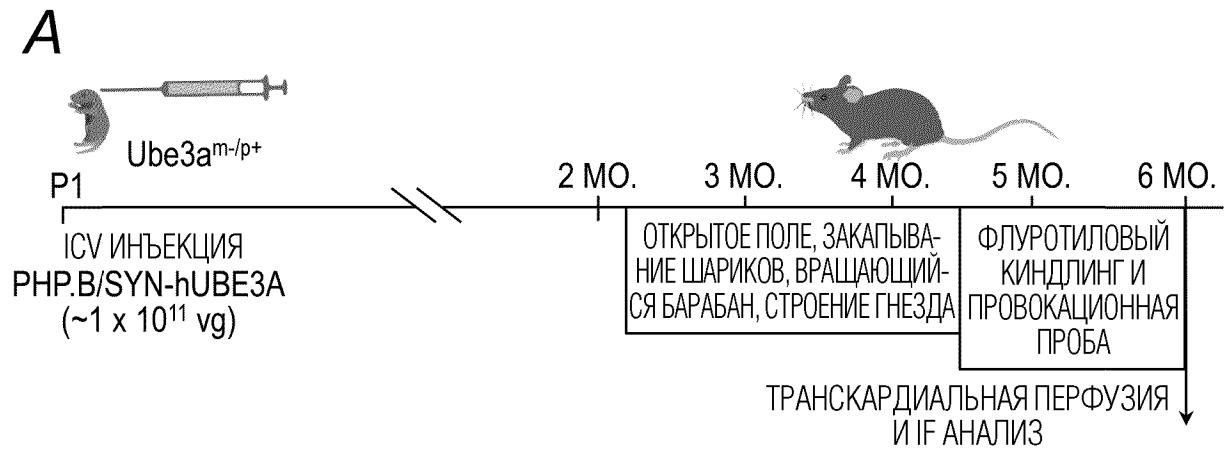
ФИГ. 8



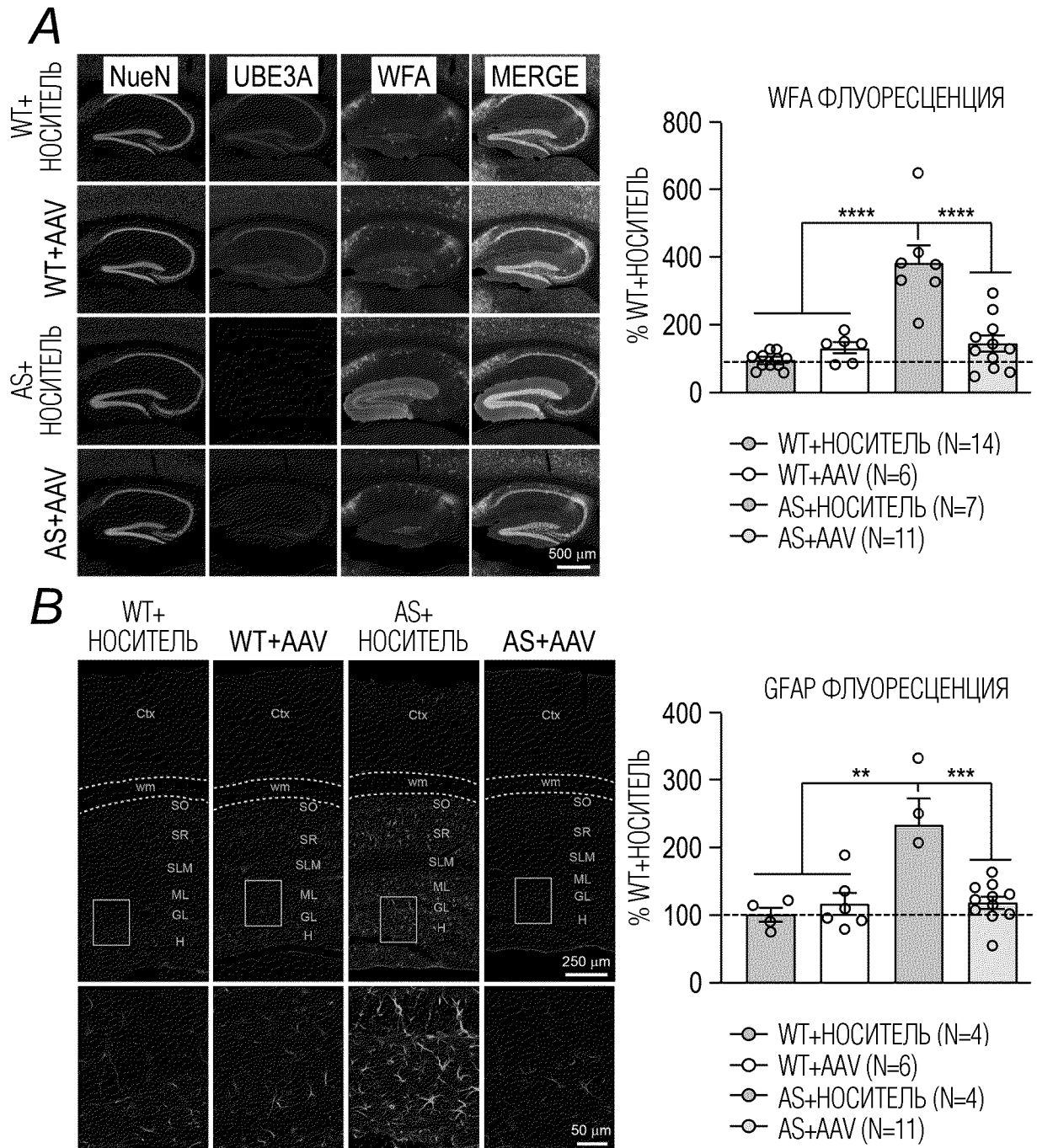
ФИГ. 9



ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12

721 **CACC** **GAATGG**CCAC AGCTTGTAAG AGATCAGGAG AACCTCAGTC TGACGACATT
 781 GAAGCT**AGCC** **GAATGA**AGCG AGCAGCTGCA AAGCATCTAA TAGAACGCTA CTACCACCAG
 841 TTAAGTGAAG GCTGTGGAAA TGAAGCCTGC ACGAATGAGT TTTGTGCTTC CTGTCCAAC
 901 TTTCTTCGTA TGGATAATAA TGCAGCAGCT ATTAAAGCCC TCGAGCTTTA TAAGATTAAT
 961 GCAAACTCT GTGATCCTCA TCCCTCCAAG AAAGGAGCAA GCTCAGCTTA CCTTGAGAAC
 1021 TCGAAAGGTG CCCCCAACAA CTCCTGCTCT GAGATAAAAA TGAACAAGAA AGGCGCTAGA
 1081 ATTGATTTTA AAGATGTGAC TTACTTAACA GAAGAGAAGG TATATGAAAT TCTTGAATTA
 1141 TGTAAGAGAA GAGAGGATTA TTCCCCTTTA ATCCGTGTTA TTGGAAGAGT TTTTCTAGT
 1201 GCTGAGGCAT TGGTACAGAG CTTCGGGAAA GTTAAACAAC ACACCAAGGA AGAACTGAAA
 1261 TCTCTTCAAG CAAAAGATGA AGACAAAGAT GAAGATGAAA AGGAAAAAGC TGCATGTTCT
 1321 GCTGCTGCTA TGGAAGAAGA CTCAGAAGCA TCTTCCTCAA GGATAGGTGA TAGCTCACAG
 1381 GGAGACAACA ATTTGCAAAA ATTAGGCCCT GATGATGTGT CTGTGGATAT TGATGCCATT
 1441 AGAAGGGTCT ACACCAGATT GCTCTCTAAT GAAAAAATTG AAAGTGCCTT TCTCAATGCA
 1501 CTTGTATATT TGTCACCTAA CGTGGAATGT GACTTGACGT ATCACAATGT ATACTCTCGA
 1561 GATCCTAATT ATCTGAATTT GTTCATTATC GTAATGGAGA ATAGAAATCT CCACAGTCCT
 1621 GAATATCTGG AAATGGCTTT GCCATTATTT TGCAAAGCGA TGAGCAAGCT ACCCCTTGCA
 1681 GCCCAAGGAA AACTGATCAG ACTGTGGTCT AAATACAATG CAGACCAGAT TCGGAGAAATG
 1741 ATGGAGACAT TTCAGCAACT TATTACTTAT AAAGTCATAA GCAATGAATT TAACAGTCGA
 1801 AATCTAGTGA ATGATGATGA TGCCATTGTT GCTGCTTCGA AGTGCTTGAA AATGGTTTAC
 1861 TATGCAAATG TAGTGGGAGG GGAAGTGGAC ACAAATCACA ATGAAGAAGA TGATGAAGAG
 1921 CCCATCCCTG AGTCCAGCGA GCTGACACTT CAGGAACTTT TGGGAGAAGA AAGAAGAAAC
 1981 AAGAAAGGTC CTCGAGTGGA CCCCTGGAA ACTGAACTTG GTGTTAAAAC CCTGGATTGT
 2041 CGAAAACCAC TTATCCCTTT TGAAGAGTTT ATTAATGAAC CACTGAATGA GGTTCCTAGAA
 2101 ATGGATAAAG ATTATACTTT TTTCAAAGTA GAAACAGAGA ACAAATCTC TTTTATGACA
 2161 TGTCCCTTTA TATTGAATGC TGTACAAAG AATTTGGGAT TATATTATGA CAATAGAATT
 2221 CGCATGTACA GTGAACGAAG AATCACTGTT CTCTACAGCT TAGTTCAAGG ACAGCAGTTG
 2281 AATCCATATT TGAGACTCAA AGTTAGACGT GACCATATCA TAGATGATGC ACTTGTCCGG
 2341 CTAGAGATGA TCGCTATGGA AAATCCTGCA GACTTGAAGA AGCAGTTGTA TGTGGAATTT
 2401 GAAGGAGAAC AAGGAGTTGA TGAGGGAGGT GTTTCCAAAG AATTTTTTCA GCTGGTTGTG
 2461 GAGGAAATCT TCAATCCAGA TATTGGTATG TTCACATACG ATGAATCTAC AAAATTGTTT
 2521 TGGTTTAATC CATCTTCTTT TGAAACTGAG GGTCAAGTTA CTCTGATTGG CATAGTACTG
 2581 GGTCTGGCTA TTTACAATAA CTGTATACTG GATGTACATT TTCCCATGGT TGTCTACAGG
 2641 AAGCTAATGG GGAAAAAAGG AACTTTTCGT GACTTGGGAG ACTCTCACCC AGTTCTATAT
 2701 CAGAGTTTAA AAGATTTATT GGAGTATGAA GGGAAATGTG AAGATGACAT GATGATCACT
 2761 TTCCAGATAT CACAGACAGA TCTTTTTGGT AACCCAATGA TGTATGATCT AAAGGAAAAAT
 2821 GGTGATAAAA TTCCAATTAC AAATGAAAAAC AGGAAGGAAT TTGTCAATCT TTATTCTGAC
 2881 TACATTCTCA ATAAATCAGT AGAAAAACAG TTCAAGGCTT TTCGGAGAGG TTTTCATATG
 2941 GTGACCAATG AATCTCCCTT AAAGTACTTA TTCAGACCAG AAGAAATGTA ATTGCTTATA
 3001 TGTGGAAGCC GGAATCTAGA TTTCCAAGCA CTAGAAGAAA CTACAGAATA TGACGGTGGC
 3061 TATACCAGGG ACTCTGTTCT GATTAGGGAG TTCTGGGAAA TCGTTCATTC ATTTACAGAT
 3121 GAACAGAAAA GACTCTTCTT GCAGTTTACA ACGGGCACAG ACAGAGCACC TGTGGGAGGA

```

721      TTTT TTATGGCCAC AGCTTGTAAG AGATCAGGAG AACCTCAGTC TGACGACATT
781 GAAGCTAGCA GGATGAAGCG AGCAGCTGCA AAGCATCTAA TAGAACGCTA CTACCACCAG
841 TTAAGTGAAG GCTGTGGAAA TGAAGCCTGC ACGAATGAGT TTTGTGCTTC CTGTCCAAC
901 TTTCTTCGTA TGGATAATAA TGCAGCAGCT ATTAAGGCC TCGAGCTTTA TAAGATTAAT
961 GCAAACTCT GTGATCCTCA TCCCTCCAAG AAAGGAGCAA GCTCAGCTTA CCTTGAGAAC
1021 TCGAAAGGTG CCCCCAACAA CTCCTGCTCT GAGATAAAAA TGAACAAGAA AGGCGCTAGA
1081 ATTGATTTTA AAGATGTGAC TTACTTAACA GAAGAGAAGG TATATGAAAT TCTTGAATTA
1141 TGTAAGAGAA GAGAGGATTA TTCCCCTTTA ATCCGTGTTA TTGGAAGAGT TTTTCTAGT
1201 GCTGAGGCAT TGGTACAGAG CTTCCGGAAA GTTAAACAAC ACACCAAGGA AGAACTGAAA
1261 TCTCTTCAAG CAAAAGATGA AGACAAAGAT GAAGATGAAA AGGAAAAAGC TGCATGTTCT
1321 GCTGCTGCTA TGGAAGAAGA CTCAGAAGCA TCTTCCTCAA GGATAGGTGA TAGCTCACAG
1381 GGAGACAACA ATTTGCAAAA ATTAGGCCCT GATGATGTGT CTGTGGATAT TGATGCCATT
1441 AGAAGGTCT ACACCAGATT GCTCTCTAAT GAAAAAATTG AAACGCCTT TCTCAATGCA
1501 CTTGTATATT TGTCACCTAA CGTGGAATGT GACTTGACGT ATCACAATGT ATACTCTCGA
1561 GATCCTAATT ATCTGAATTT GTTCATTATC GTAATGGAGA ATAGAAATCT CCACAGTCCT
1621 GAATATCTGG AAATGGCTTT GCCATTATTT TGCAAAGCGA TGAGCAAGCT ACCCCTTGCA
1681 GCCCAAGGAA AACTGATCAG ACTGTGGTCT AAATACAATG CAGACCAGAT TCGGAGAATG
1741 ATGGAGACAT TTCAGCAACT TATTACTTAT AAAGTCATAA GCAATGAATT TAACAGTCGA
1801 AATCTAGTGA ATGATGATGA TGCCATTGTT GCTGCTTCGA AGTGCTTGAA AATGGTTTAC
1861 TATGCAAATG TAGTGGGAGG GGAAGTGGAC ACAAATCACA ATGAAGAAGA TGATGAAGAG
1921 CCCATCCCTG AGTCCAGCGA GCTGACACTT CAGGAACTTT TGGGAGAAGA AAGAAGAAAC
1981 AAGAAAGGTC CTCGAGTGGA CCCCTGGAA ACTGAACTTG GTGTTAAAC CCTGGATTGT
2041 CGAAAACCAC TTATCCCTTT TGAAGAGTTT ATTAATGAAC CACTGAATGA GGTCTAGAA
2101 ATGGATAAAG ATTATACTTT TTTCAAAGTA GAAACAGAGA ACAAATTCTC TTTTATGACA
2161 TGTCCCTTTA TATTGAATGC TGTCAAAAG AATTTGGGAT TATATTATGA CAATAGAATT
2221 CGCATGTACA GTGAACGAAG AATCACTGTT CTCTACAGCT TAGTTCAAGG ACAGCAGTTG
2281 AATCCATATT TGAGACTCAA AGTTAGACGT GACCATATCA TAGATGATGC ACTTGTCGG
2341 CTAGAGATGA TCGCTATGGA AAATCCTGCA GACTTGAAGA AGCAGTTGTA TGTGGAATTT
2401 GAAGGAGAAC AAGGAGTTGA TGAGGGAGGT GTTTCCAAAG AATTTTTTCA GCTGGTTGTG
2461 GAGGAAATCT TCAATCCAGA TATTGGTATG TTCACATACG ATGAATCTAC AAAATTGTTT
2521 TGGTTTAATC CATCTTCTTT TGAACTGAG GGTGAGTTTA CTCTGATTGG CATAGTACTG
2581 GGTCTGGCTA TTTACAATAA CTGTATACTG GATGTACATT TTCCCATGGT TGTCTACAGG
2641 AAGCTAATGG GGAAAAAAGG AACTTTTCGT GACTTGGGAG ACTCTCAGG AGTTCTATAT
2701 CAGAGTTTAA AAGATTTATT GGAGTATGAA GGAATGTGG AAGATGACAT GATGATCACT
2761 TTCCAGATAT CACAGACAGA TCTTTTGGT AACCCAATGA TGTATGATCT AAAGGAAAAT
2821 GGTGATAAAA TTCCAATTAC AAATGAAAAC AGGAAGGAAT TTGTCAATCT TTATTCTGAC
2881 TACATTCTCA ATAAATCAGT AGAAAAACAG TTCAAGGCTT TTCGGAGAGG TTTTCATATG
2941 GTGACCAATG AATCTCCCTT AAAGTACTTA TTCAGACCAG AAGAAATTGA ATTGCTTATA
3001 TGTGGAAGCC GGAATCTAGA TTTCCAAGCA CTAGAAGAAA CTACAGAATA TGACGGTGGC
3061 TATACCAGGG ACTCTGTTCT GATTAGGGAG TTCTGGGAAA TCGTTCATTC ATTTACAGAT
3121 GAACAGAAAA GACTCTTCTT GCAGTTTACA ACGGGCACAG ACAGAGCACC TGTGGGAGGA

```