

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290001 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.28

(22) Дата подачи заявки
2020.06.03

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО-МАРИ-ТУТА

(31) 1907882.3

(32) 2019.06.03

(33) GB

(86) PCT/EP2020/065312

(87) WO 2020/245169 2020.12.10

(71) Заявитель:

ЗЕ КАЙПРОС ФОУНДЭЙШН ФОР
МУСКУЛАР ДИСТРОФИ РЕСЕРЧ
(СУ)

(72) Изобретатель:

Клеопа Клеопас, Кагиава Алексиа,
Шиза Натаса, Саргианнидоу Ирен
(СУ)

(74) Представитель:

Рыбина Н.А., Рыбин В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены вирусные векторы для применения в лечении и профилактике заболеваний, связанных со шванновскими клетками, путем специфичной доставки полинуклеотидов в шванновские клетки и достижения специфичной экспрессии в шванновских клетках. Данное изобретение имеет особое применение в лечении и профилактике болезни Шарко-Мари-Тута и других демиелинизирующих нейропатий.



A1

202290001

202290001

A1

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

Область техники

Данное изобретение относится к вирусным векторам, направленным на заболевания, связанные со шванновскими клетками.

Уровень техники

Болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ) включает в себя множество типов несиндромных наследственных нейропатий, которые вместе считаются одними из наиболее распространенных нейрогенетических нарушений, при этом частота данных нарушений у индивидуумов достигает 1 : 2500 от общего объема популяции (1, 2). Нейропатии ШМТ характеризуются вовлечением постоянно увеличивающегося числа генов, являющихся причиной данных нарушений, и перекрывающихся фенотипов, вызванных разными генами. Более того, несколько разных генов могут вызывать идентичные фенотипы. Несмотря на растущее понимание сложной генетической основы и разнообразных патологических механизмов, лежащих в основе нейропатий ШМТ, в данное время не существует эффективного лечения какой-либо из форм ШМТ, и пациентам может быть предложена только симптоматическая и поддерживающая терапия. Таким образом, существует большая потребность в новых стратегиях лечения ШМТ. В последние два десятилетия были предприняты попытки разработать генную терапию для лечения ШМТ. В то время как различные генно-терапевтические подходы являются многообещающими для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы (ПНС) в будущем, предстоит решить множество проблем (3).

Например, в работе (49) показано, как можно достичь терапевтического эффекта при лечении ШМТ4С с помощью лентивирусного вектора. Однако этот эффект был частичным, а лентивирусный вектор имеет ограничения по безопасности для лечения человека *in vivo*. Ранее другие векторы, такие как аденоассоциированные вирусные векторы (AAV), не считались полезными, поскольку, несмотря на то, что они более стабильны и не интегрируются в геном хозяина, из-за их максимальной упаковочной способности,

составляющей около 4,4 т. п. о., полезность AAV в стратегиях генной терапии была ограничена, особенно в случаях, когда заменяемый ген имеет относительно большую длину.

Методики генной терапии, нацеленные на шванновские клетки, могут применяться ко многим другим заболеваниям, связанным со шванновскими клетками, помимо ШМТ, например, к болезни двигательных нейронов (БДН), и включают в себя те, которые не вызваны исключительно генетическими факторами. Многие из этих заболеваний имеют несколько причин и изучены не до конца, поэтому нацеливание на эти заболевания с использованием вирусных векторов может быть особенно выгодным.

В целом, остается потребность в улучшенных способах нацеливания на заболевания, связанные со шванновскими клетками, включая демиелинизирующие neuropатии, такие как ШМТ, для достижения лучших терапевтических эффектов.

Сущность изобретения

Авторы данного изобретения впервые разработали полезные средства для доставки полинуклеотидов, например, терапевтических полинуклеотидов, в шванновские клетки периферической нервной системы (ПНС) и для стимулирования экспрессии указанных полинуклеотидов, в частности, в шванновских клетках. Данное изобретение может применяться для лечения заболеваний, связанных со шванновскими клетками, и считается особенно полезным для применения в лечении демиелинизирующих neuropатий, таких как болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ). Однако механизм, лежащий в основе данного изобретения, считается применимым ко многим другим заболеваниям, которые поражают шванновские клетки, а также считается имеющим общую полезность в любой ситуации, когда доставка полинуклеотида в шванновскую клетку считается выгодной, например, при визуализации шванновских клеток.

Особенностью одного из аспектов данного изобретения является использование вектора AAV для достижения транскрипции первой нуклеиновой кислоты, приводящей к продукции первого представляющего интерес полинуклеотида, в частности, в шванновских клетках ПНС. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эта специфичная в отношении клеточного типа экспрессия достигается с использованием промотора, специфичного в отношении миелина, и в некоторых вариантах осуществления

данного изобретения это достигается с использованием минимальной версии промотора, специфичного в отношении миелина.

Другим отличительным признаком данного изобретения является обеспечение минимального промотора, специфичного в отношении миелина, который в некоторых вариантах осуществления данного изобретения основан на последовательности полноразмерного промотора миелинового белка ноль (Mrz). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, которые содержат более короткий минимальный промотор, позволяют включать в данный вектор последовательности нуклеиновых кислот большей длины, например, последовательности терапевтических нуклеиновых кислот, и доставлять их в шванновские клетки. Считается, что это имеет выгодное свойство – обеспечение универсального вектора для доставки нуклеиновых кислот в шванновские клетки, и может использоваться для лечения большого спектра заболеваний, поскольку современные подходы ограничены, например, генами, которые могут быть экспрессированы из вирусного вектора из-за их размера.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение определено прилагаемой формулой изобретения.

В общем, в данном изобретении представлен вирусный вектор, описанный в данном документе, для применения в медицине, а также представлен способ терапии, который включает в себя введение вектора согласно данному изобретению, например, введение любым из способов, описанных в данном документе.

В первом аспекте данного изобретения представлен вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид.

Указанный вирусный вектор может представлять собой любой вирусный вектор.

Вирусные векторы хорошо известны в данной области техники, и примеры включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: аденоассоциированные вирусные векторы

(векторы AAV); лентивирусные векторы (например, полученные из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)); ретровирусные векторы (например, MMLV).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор (вектор AAV). В предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении представлен вектор AAV для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанный вектор AAV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид.

Предпочтительно, если указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты транскрибируется, например, транскрибируется в целевой клетке или в целевом организме. Соответственно, в следующем варианте осуществления в данном изобретении представлен вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в первый полинуклеотид.

В следующем варианте осуществления данного изобретения представлен AAV для лечения или профилактики заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в первый полинуклеотид.

Указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты может транскрибироваться в первый полинуклеотид в целевой клетке или в целевом организме, например, транскрибируется в шванновской клетке. Шванновская клетка может находиться *in vivo*, например, в организме млекопитающего, которым, например, может быть человек, кошка, собака, мышь, кролик, лошадь.

Шванновские клетки – это глиальные клетки периферической нервной системы (ПНС), которые покрывают аксоны сенсорных и моторных нейронов, и образуют окружающую миелиновую оболочку. Миелиновая оболочка состоит из нескольких белковых компонентов (например, миелинового белка ноль) и является важным изолирующим

компонентом нейронов, который позволяет быстро проводить нервные импульсы (потенциалы действия) по нервам.

Некоторые современные терапевтические стратегии на основе вирусных векторов используют векторы, которые имеют нежелательные характеристики. Например, некоторые вирусные векторы интегрируются в геном хозяина с очевидными потенциальными вредными последствиями. Соответственно, в одном варианте осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор не представляет собой вирусный вектор, который интегрируется в геном клетки-хозяина, например, он не будет интегрироваться в нуклеиновую кислоту шванновской клетки. Вирусные векторы, которые, как считается, не интегрируются в геном хозяина, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения являются особенно предпочтительными и включают в себя векторы AAV и аденовирусные векторы. Векторы AAV инфицируют целевые клетки, и доставленный генетический материал не интегрируется в геном клетки-хозяина. Вместо этого доставленный генетический материал остается эписомальным.

Вирусные векторы, которые, как считается, интегрируются в геном хозяина, включают в себя ретровирусные векторы, например, лентивирусные векторы. Соответственно, в одном варианте осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор не представляет собой вектор, который интегрируется в геном хозяина, например, не представляет собой ретровирусный вектор, например, не представляет собой лентивирусный вектор.

Также, некоторые векторы не способны трансдуцировать шванновские клетки. Квалифицированный специалист поймет, какие из типов векторов могут и не могут трансдуцировать шванновские клетки. Соответственно, в одном варианте осуществления данного изобретения вирусный вектор согласно данному изобретению не представляет собой вирусный вектор, который не может трансдуцировать шванновские клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор обладает способностью трансдуцировать шванновские клетки. Под «трансдукцией» авторы данного изобретения подразумевают, что вирусный вектор способен инфицировать целевые клетки и доставлять обнаруживаемую в нем полинуклеотидную конструкцию в данную целевую клетку. Примеры таких векторов включают в себя векторы AAV и лентивирусные векторы.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанный вектор представляет собой вектор, в который может быть включена только вставка ограниченного размера, прежде чем она станет нестабильной. Например, такие векторы включают в себя векторы AAV.

Предпочтительно, указанный вирусный вектор представляет собой вектор AAV, и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор AAV выбран из группы, содержащей или состоящей из: AAV9 и AAVrh10. В особенно предпочтительном варианте осуществления данного изобретения AAV представляет собой AAV9.

Предпочтительно, чтобы транскрипция указанной первой нуклеиновой кислоты происходила только в, или по существу происходила только в шванновских клетках. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор также содержит промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, функционально связанный с указанной первой нуклеиновой кислотой.

Под термином «промотор, специфичный в отношении шванновских клеток» авторы данного изобретения подразумевают промотор, который приводит к значительной экспрессии в шванновских клетках и отсутствию или низкой экспрессии в нешванновских клетках. Например, промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, может способствовать высоким уровням транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты в шванновских клетках (например, 95% или больше от общей экспрессии происходит в шванновских клетках), тогда как экспрессия указанного первого полинуклеотида является низкой в других типах клеток, например, в клетках из центральной нервной системы (например, меньше чем 5% от общей экспрессии происходит в клетках, отличных от шванновских). Например, в одном варианте осуществления данного изобретения соотношение транскрипции в шванновских клетках и транскрипции в нешванновских клетках составляет по меньшей мере 100 : 0; 95 : 5; 90 : 10; 85 : 15; 80 : 20; 75 : 25; 70 : 30; 65 : 35; 60 : 40; или 55 : 45.

В одном варианте осуществления данного изобретения уровень транскрипции в шванновской клетке является по меньшей мере в 1,5, в 2, в 3, в 4, в 5, в 6, в 7, в 8, в 9, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50, в 60, в 70, в 80, в 90, в 100, в 250, в 500, в 750, в 1000, в 2500, в 5000, в 7500, в 10000 раз более высоким, чем в любой другой, нешванновской клетке.

В одном варианте осуществления данного изобретения промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, приводит к тому, что большая часть экспрессии происходит в шванновских клетках, а не в нешванновских клетках.

Специалист поймет, что даже промоторы с очень высокой специфичностью могут приводить к некоторой экспрессии в других клетках или тканях. Специалисту в данной области техники хорошо известно о разном уровне экспрессии между целевой клеткой или целевой тканью и нецелевой клеткой или нецелевой тканью, который требуется для классификации промотора как специфичного в отношении данной клетки или данной ткани, например, как специфичного в отношении шванновской клетки. Например, в работах (66) и (67) демонстрируется идентификация клеточно-специфичных промоторов в центральной нервной системе (ЦНС). Специалисту известно, что для того, чтобы промотор был клеточно-специфичным, он должен содержать регуляторные элементы, которые активируют промотор только в определенных типах клеток (например, сайты связывания для факторов транскрипции), и данный промотор должен обладать способностью вызывать обнаруживаемую экспрессию репортерных генов или других генов *in vitro* и *in vivo*.

Предпочтительно, промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, приводит к транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты на обнаруживаемом уровне только в шванновских клетках. Специалисту хорошо известны стандартные методы обнаружения транскрипции, например, нозерн-блот, методики на основе ПЦР и иммунофлуоресцентное мечение. В одном варианте осуществления данного изобретения промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, приводит к обнаруживаемой транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты в шванновских клетках, но не приводит к обнаруживаемым уровням транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты в нешванновских клетках, например, в других клетках периферической нервной системы или головного мозга, когда обнаружение выполняют с помощью нозерн-блота. В другом варианте осуществления данного изобретения промотор, специфичный в отношении шванновских клеток, приводит к обнаруживаемой транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты в шванновских клетках, но не приводит к обнаруживаемым уровням транскрипции указанной первой нуклеиновой кислоты в нешванновских клетках, например, в других клетках периферической нервной системы или головного мозга, когда обнаружение выполняют с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием клеточных маркеров.

Например, в работах (32) и (33) демонстрируется, что специфическая экспрессия в шванновских клетках может быть достигнута как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием конструкций, управляемых полноразмерным промотором Mrz, с использованием лентивирусных векторов.

Промоторы, специфичные в отношении шванновских клеток, включают в себя, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, промоторы, специфичные в отношении миелина. Под термином «промотор, специфичный в отношении миелина» авторы данного изобретения подразумевают промотор, который обычно управляет экспрессией генов, кодирующих белки, составляющие миелиновую оболочку. Примеры промоторов, специфичных в отношении миелина, включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: промотор миелинового белка ноль (Mrz); промотор периферического миелинового белка 22 (PMP22); промотор миелин-ассоциированного гликопротеина (Mag).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем полноразмерного промотора миелинового белка ноль (Mrz), такого как полноразмерный промотор миелинового белка ноль крысы (Mrz), последовательность которого определена в SEQ ID NO. 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность промотора Mrz имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 4, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения специалисту будет понятно, что предпочтительно, чтобы промоторная последовательность происходила из человеческой или гуманизированной промоторной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем полноразмерного промотора миелинового белка ноль человека (hP0), последовательность которого определена в SEQ ID NO. 18. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность промотора hP0 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 18 или которая по меньшей мере на 75% идентична

последовательности с SEQ ID NO. 18, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 18 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 18.

Как обсуждалось выше, считается предпочтительным, чтобы промотор был как можно короче, в частности, когда вектор представляет собой вектор, который может содержать вставку только ограниченного размера, прежде чем данный вектор станет нестабильным. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем промотора, длина которого составляет от 100 п. о. до 1100 п. о., необязательно при этом длина промотора составляет от 200 п. о. до 900 п. о., длина промотора составляет от 300 п. о. до 800 п. о., длина промотора составляет от 400 п. о. до 700 п. о., необязательно при этом длина промотора составляет от 500 п. о. до 600 п. о., например, длина промотора составляет 410 п. о. В том же или в других вариантах осуществления данного изобретения длина промотора составляет меньше чем 1100 п. о., например, меньше чем 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о. или меньше чем 100 п. о.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения промотор представляет собой встречающийся в природе промотор Mrz с длиной, которая определена в данном документе. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения промотор представляет собой сконструированный промотор Mrz с длиной, которая определена в данном документе. Под термином «встречающийся в природе промотор» авторы данного изобретения подразумевают промотор, который не был модифицирован, укорочен или удлинен по сравнению с соответствующей последовательностью промотора, которая обнаруживается в шванновских клетках дикого типа. Под термином «сконструированный промотор» авторы данного изобретения подразумевают промотор дикого типа, который был каким-либо образом изменен. Например, указанная последовательность может быть модифицирована, чтобы быть, например, по меньшей мере на 75% гомологичной последовательности встречающегося в природе промотора или идентичной последовательности встречающегося в природе промотора, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентичной последовательности встречающегося в природе промотора или гомологичной последовательности встречающегося в природе промотора. В другом или в том же варианте

осуществления данного изобретения промотор также может быть модифицирован по длине, например, длина промотора дикого типа может быть уменьшена с более длинной последовательности до последовательности длиной, например, от 100 п. о. до 1100 п. о., необязательно – длиной от 200 п. о. до 900 п. о., длиной от 300 п. о. до 800 п. о., длиной от 400 п. о. до 700 п. о., необязательно – длиной от 500 п. о. до 600 п. о., например, до последовательности длиной в 410 п. о., или до последовательности длиной меньше чем 1100 п. о., например, до последовательности длиной меньше чем 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о. или длиной меньше чем 100 п. о.

В другом варианте осуществления данного изобретения длина промотора может быть увеличена по сравнению с промотором дикого типа.

Специалист поймет, что, возможно, для активности промотора на самом деле требуются только части определенной области нуклеиновой кислоты, которая считается промотором. В другом примере сконструированный промотор включает в себя часть последовательности промотора дикого типа или включает в себя всю последовательность промотора дикого типа как часть более длинной промоторной последовательности. Как обсуждалось, предпочтительно, чтобы промотор был специфически активен в шванновских клетках. Специалист может проверить, приводит ли конкретный фрагмент полноразмерного промотора к специфической экспрессии белка в шванновских клетках под контролем указанного промоторного фрагмента, например, путем скрининга экспрессии репортерного гена в шванновских клетках. В некоторых примерах репортерный ген представляет собой EGFP.

В другом варианте осуществления данного изобретения сконструированный промотор представляет собой усеченную версию промотора дикого типа и может быть, например, на 75% гомологичным последовательности встречающегося в природе промотора или идентичным последовательности встречающегося в природе промотора, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентичным последовательности встречающегося в природе промотора или гомологичным последовательности встречающегося в природе промотора.

В дополнение к тому, что он представляет собой усеченную версию нативного промотора, сконструированный промотор может дополнительно или альтернативно содержать мутации, замены, делеции и вставки относительно последовательностей нативного промотора. Например, сконструированный промотор может содержать всевозможные разные области нативного промотора в одной неразрывной последовательности.

Сконструированный промотор, длина которого меньше, чем длина соответствующего нативного промотора или промотора дикого типа, можно назвать минимальным промотором.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированный промотор сохраняет ту же функцию, что и соответствующий встречающийся в природе промотор, из которого он получен, т. е. он все еще может эффективно управлять транскрипцией полинуклеотидных последовательностей из последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми данный промотор функционально связан, и может в предпочтительных случаях эффективно управлять транскрипцией клеточно-специфичным способом, то есть специфичным в отношении шванновских клеток способом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия указанного первого полинуклеотида может находиться под контролем, например, укороченного встречающегося в природе промотора, специфичного в отношении миелина, который в данном документе называется минимальным специфичным в отношении миелина промотором, необязательно, он представляет собой минимальный промотор миелинового белка ноль (Mrz). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность указанного минимального специфичного в отношении миелина промотора включает в себя или состоит из последовательности длиной 410 п. о., как определено в последовательности с SEQ ID NO. 5, которая получена из полноразмерной промоторной последовательности Mrz крысы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор включает в себя или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предпочтительно, чтобы указанный минимальный промотор происходил из человеческой или гуманизированной промоторной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность указанного минимального специфичного в отношении миелина промотора включает в себя или состоит из последовательности длиной 429 п. о., как определено в последовательности с SEQ ID NO. 22, которая получена из полноразмерной промоторной последовательности hP0 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор включает в себя или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 22 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 22 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 22. Минимальные специфичные в отношении миелина промоторы, полученные из Mrz крысы или из hP0 человека, в данном документе называются miniMrz.

Под терминами «идентична (-ы) последовательности (-ям)» или «гомологична (-ы) последовательности (-ям)» авторы данного документа подразумевают идентичную последовательность пар оснований в конкретной области ДНК. Например, в последовательности, которая на 75% гомологична референсной последовательности или которая на 75% идентична референсной последовательности, 75% пар оснований идентичны.

Процент идентичности последовательностей двух полипептидов можно определить с помощью соответствующих компьютерных программ, например, программы GAP Генетической вычислительной группы Университета штата Висконсин, и будет понятно, что процент идентичности рассчитывается по отношению к полипептидам, последовательности которых были оптимально выровнены.

В качестве альтернативы, выравнивание можно выполнить с помощью программы Clustal W (Thompson *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673 - 80). Используемые параметры могут быть следующими:

Параметры быстрого попарного выравнивания: К-кратный размер слова, 1; размер окна, 5; штраф за гэп, 3; число верхних диагоналей, 5. Метод оценки: x процентов.

Параметры множественного выравнивания: штраф за открытие гэпа, 10; штраф за продление гэпа, 0,05.

Матрица оценки: BLOSUM.

В одном варианте осуществления данного изобретения минимальный промотор Mrz, описанный в данном документе, может быть получен так, как описано в примере 9, например, как область длиной в 410 пар оснований перед стартовым кодоном полноразмерного промотора, например, полноразмерного промотора миелинового белка ноль (Mrz). В другом варианте осуществления данного изобретения описанный в данном документе минимальный промотор Mrz может быть получен так, как описано в примере 13. Векторы AAV обладают способностью переносить полинуклеотиды, максимальный размер которых составляет около 4,4 т. п. о., поэтому использование более короткого промотора Mrz, как описано в данном документе, а не полноразмерного промотора Mrz, длина которого составляет около 1,1 т. п. о., имеет преимущество – позволяет использовать более длинные последовательности указанной первой нуклеиновой кислоты, которые предстоит функционально связать с промоторной областью для упаковки в AAV. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых промотор представляет собой более короткий промотор, например, длиной от 100 п. о. до 1100 п. о., от 200 п. о. до 900 п. о., от 300 п. о. до 800 п. о., от 400 п. о. до 700 п. о., от 500 п. о. до 600 п. о., или длиной в 410 п. о., или длиной меньше чем 1100 п. о., например, длиной меньше чем 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о., или длиной меньше чем 100 п. о., например, сконструированный промотор или минимальный промотор, это позволяет применять данное изобретение к более широкому спектру генов большей длины, по сравнению с тем, что позволяет применение векторов AAV, в которых используется полноразмерный промотор. Например, на сегодняшний день бывают ситуации, когда невозможно вставить последовательность нуклеиновой кислоты определенной длины, например ген, в AAV, поскольку длина данной нуклеиновой кислоты может превышать максимальную емкость AAV, когда используются более длинные промоторы, например, когда используется полноразмерный промотор Mrz. Например, если первая нуклеиновая кислота, например, терапевтический ген, имеет длину, составляющую больше чем 3,0 т. п. о. – 3,3 т. п. о. (4,4 т. п. о. - 1,1 т. п. о. = 3,3 т. п. о.). В этом случае использование предпочтительных более коротких промоторов, описанных в данном документе, например, минимального специфичного в отношении миелина

промотора, позволяет применять данное изобретение, например, для замены более длинных генов, таких как ген SH3TC2, который вызывает ШМТ типа 4С (ШМТ4С), длина которого составляет около 3,9 т. п. о. Другие связанные со шванновскими клетками гены, которые могут быть близки к пределу стабильности AAV и поэтому будут оптимально доставляться под минимальным промотором Mrz, включают в себя EGR2 (2,98 т. п. о.), который связан с ШМТ4Е, и FGD4 (2,3 т. п. о.), который связан с ШМТ4Н.

В других дополнительных вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе векторы могут быть модифицированы в сегменте инвертированного концевой повтора для дальнейшего уменьшения их размера. Например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), как описано в примере 1, может быть удален, и (или) последовательность полиА может быть заменена минимальным синтетическим полиА (68, 69). Такие модификации могут дополнительно уменьшить размер вектора, чтобы он мог повторно рассылаться в пределах максимальной емкости AAV и обеспечить эффективную упаковку при доставке более крупных генов. В других дополнительных вариантах осуществления данного изобретения размер вектора можно дополнительно уменьшить, например, также используя минимальные версии доставляемого гена, кодирующего данный белок, при этом минимальная версия гена, кодирующего данный белок, все еще способна продуцировать функциональный белок.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанный в данном документе вирусный вектор может быть получен так, как описано в примере 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусный вектор имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 20, в которой удален WPRE и которая имеет синтетическую последовательность полиА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная синтетическая последовательность полиА содержит или состоит из минимальной последовательности, необходимой для эффективного полиаденилирования конструкций иРНК (68, 69). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная синтетическая последовательность полиА содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 24, которая включена в последовательности с SEQ ID NO: 20 и 21. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная синтетическая последовательность полиА по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 24 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 24.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор также содержит сайты связывания для факторов транскрипции Egr2 и Sox10. Например, указанный вирусный вектор может также содержать энхансерные элементы, с которыми могут связываться факторы транскрипции, такие как Egr2 и Sox10.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота указанного вирусного вектора транскрибируется в первый полинуклеотид, который в некоторых вариантах осуществления данного изобретения кодирует и транслируется в первый полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота представляет собой открытую рамку считывания (ОРС, англ. «ORF») последовательности гена или кДНК, соответствующей последовательности гена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота представляет собой ОРС или кДНК дикого типа, или другую терапевтически полезную генную последовательность. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота представляет собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа или последовательности терапевтически полезного гена, ассоциированного с нейропатией, при этом указанная нейропатия необязательно представляет собой демиелинизирующую нейропатию.

Под термином «дикий тип или терапевтически полезная форма» авторы данного изобретения подразумевают любую форму последовательности гена, которая кодирует полипептид или белок, который можно использовать для эффективного лечения заболевания, связанного со шванновскими клетками. Специалист поймет, что это, как правило, форма белка дикого типа (т. е. та, которая встречается в природе в шванновских клетках) в ситуациях, когда заболевание возникает из-за недостаточной продукции формы полипептида дикого типа шванновскими клетками, но может также включать в себя формы белка, которые имеют мутации или вставки, или которые укорочены по сравнению с последовательностью дикого типа, чтобы обеспечить терапевтическое преимущество, например, повышенные уровни экспрессии, устойчивость к деградации, повышенную стабильность, повышенную активность или выгодное усиление функции, или чтобы подавить токсическое усиление функции. Например, в последнем случае указанный полипептид может представлять собой антитело, способное связываться с мутантом, обладающим токсическим усилением функции, и подавлять его токсичность.

Специалисту известно, что экспрессия белка обычно осуществляется путем введения ОРС соответствующего гена или кДНК в вирусный вектор. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность кДНК, которая при транскрипции дает первый полинуклеотид, который транслируется в первый полипептид или белок. Например, кДНК может представлять собой последовательность кДНК, которая транскрибируется в иРНК GJB1, которая впоследствии транслируется в белок Cx32.

Специалист поймет, что использование последовательностей ОРС, а не последовательностей кДНК, может быть предпочтительным в некоторых случаях, поскольку в последовательности ОРС отсутствуют дополнительные некодирующие элементы, обнаруживаемые в кДНК, и поскольку ОРС имеет меньший размер, что особенно выгодно в данном изобретении, когда вирусный вектор – это вектор, который становится нестабильным, когда размер увеличивается выше определенного порога.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения первая последовательность нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, также необязательно содержит другие регуляторные элементы в дополнение к кДНК или ОРС гена. Указанные дополнительные элементы могут быть расположены в направлении к 3' от ОРС.

Как обсуждалось выше, данное изобретение может применяться для профилактики или лечения заболевания, связанного со шванновскими клетками. Под термином «заболевание, связанное со шванновскими клетками» авторы данного изобретения подразумевают все заболевания, которые связаны с нарушенным функционированием шванновских клеток. Данное понятие охватывает собой заболевания, связанные с разрушением миелиновой оболочки, образованной шванновскими клетками, и (или) заболевания, связанные со сниженной экспрессией миелиновой оболочки, образованной шванновскими клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевания, связанные со шванновскими клетками, представляют собой демиелинизирующие нейропатии. Примеры демиелинизирующих нейропатий включают в себя, но не ограничиваются ей, болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ).

«Заболевание, связанное со шванновскими клетками» также включает в себя в своем значении заболевания, которые связаны со шванновскими клетками, но которые также связаны, например, с другими типами клеток или тканей. Считается, что данное изобретение полезно в таких ситуациях, поскольку улучшение функции шванновских клеток может облегчить некоторые симптомы, даже если данное изобретение не нацелено на какие-либо другие типы клеток, которые связаны данным с заболеванием.

Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики заболевания, выбранного из группы, состоящей из следующего: болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ); наследственная компрессионная нейропатия (НКН, англ. «HNPP»); диабетические и другие токсические периферические нейропатии; болезнь двигательных нейронов (БДН).

В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики болезни Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X); болезни Шарко – Мари – Тута типов 1A-1F (т. е. ШМТ1А, ШМТ1В, ШМТ1С, ШМТ1D, ШМТ1Е и ШМТ1F); болезни Шарко – Мари – Тута типов 4А-4Н (т. е. ШМТ4А, ШМТ4В, ШМТ4С, ШМТ4D, ШМТ4Е, ШМТ4F, ШМТ4G и ШМТ4Н). В более конкретном варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики болезни Шарко – Мари – Тута типа 1X. В альтернативном более конкретном варианте осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения или профилактики болезни Шарко – Мари – Тута типа 4С.

Болезнь Шарко-Мари Тута (ШМТ) – это группа демиелинизирующих нейропатий, вызываемых мутациями во множестве различных генов, приводящими к перекрывающимся фенотипам. Нейропатия Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X) является второй по распространенности формой ШМТ (4, 5) и проявляется характерными симптомами ШМТ1, включая прогрессирующую слабость и атрофию, начинающуюся в дистальных мышцах нижних конечностей, трудности с бегом и частые растяжения лодыжек, с началом к 10 годам или раньше у наиболее пораженных субъектов-мужчин (6-8). Данное заболевание медленно прогрессирует, вызывая слабость мышц нижних конечностей, провисание стопы, деформации стопы, слабость мышц рук и потерю чувствительности в дистальных отделах

с иногда болезненными парестезиями в позднем подростковом или раннем взрослом возрасте, и с медленным прогрессированием в течение жизни. У гетерозиготных женщин ШМТ1Х может протекать бессимптомно или у них могут развиваться более легкие клинические проявления в более старшем возрасте, но сообщалось также об исключительно тяжелой нейропатии (9, 10). Преходящие проявления со стороны ЦНС могут возникать у некоторых, в основном, более молодых пациентов с ШМТ1Х (11). Промежуточное замедление (30-40 м/с) скорости проводимости двигательных нервов (СПДН, англ. «MNCV») и прогрессирующая потеря двигательных единиц из-за зависимой от длины дегенерации аксонов являются типичными электрофизиологическими особенностями (6, 7). Биопсия нервов показывает смешанные аксональные и демиелинизирующие нарушения (12, 13) с тонкими миелиновыми оболочками и потерей крупных миелинизированных волокон, замененных регенерирующими кластерами аксонов (6, 14).

Cx32 представляет собой трансмембранный белок, образующий каналы щелевых контактов (ЩК, англ. «GJ») через некомпактные миелиновые слои, специфически экспрессируемый миелинизирующими шванновскими клетками в периферической нервной системе (ПНС), а также подмножеством олигодендроцитов в ЦНС. Каналы ЩК, образованные белком Cx32, выполняют важные гомеостатические и сигнальные функции, которые необходимы для функционирования и выживания миелина и аксонов (4, 5). Соответствующим геном, кодирующим Cx32, является ген GJB1.

По состоянию на настоящее время сообщается о больше чем 400 мутациях GJB1, встречающихся в открытой рамке считывания (ОРС), и многие из них происходят более чем в одном семействе, в том числе: 498 миссенс-мутаций (71%); 3 мутации с потерей стоп-кодона; 49 мутаций в рамке считывания по типу ВД (вставка/делеция, англ. «INDEL»; 7%); 25 мутаций с появлением стоп-кодона (4%); и 122 мутации по типу ВД со сдвигом рамки считывания (17%) (http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/). Сообщалось также о нескольких мутациях в некодирующих областях GJB1. Сдвиг рамки считывания, преждевременная остановка и некодирующие мутации могут привести к полной потере синтеза белка или быстрой деградации, и не ожидается, что они приведут к каким-либо доминантно-негативным эффектам. Несколько миссенс-мутаций и мутаций в рамке считывания, экспрессируемых *in vitro*, показали внутриклеточную задержку (15-17) в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и (или) в аппарате Гольджи (АГ) (17-21) с неспособностью сформировать функциональные каналы. Некоторые из них также оказывали доминантно-негативные эффекты на коэкспрессируемый Cx32 дикого типа (15).

Другие мутанты образовывали функциональные каналы с измененными биофизическими характеристиками (19). У мышей с нокаутом гена (НГ, англ. «КО») Cx32 с полной делецией гена Gjb1/Cx32 развивается прогрессирующая, преимущественно двигательная демиелинизирующая периферическая нейропатия, начиная с возраста около трех месяцев, со снижением седалищной СПДН и двигательной амплитуды (24, 25). Экспрессия белка Cx32 дикого типа (ДТ) человека, управляемая промотором Mpz/P0 крысы, предотвращала демиелинизацию у мышей с НГ Cx32 (26), подтверждая, что потеря автономной экспрессии белка Cx32 шванновскими клетками является достаточной, чтобы вызвать патологию ШМТ1Х.

Таким образом, несколько исследований мутантов ШМТ1Х *in vitro* и *in vivo* подтверждают общий вывод о том, что потеря функции Cx32 главным образом приводит к нейропатии при ШМТ1Х (8, 17 - 19, 21 - 23). Соответственно, в одном варианте осуществления данного изобретения генная заместительная терапия с использованием вирусного вектора и терапевтических способом, как описано в данном документе, применяется для лечения или предотвращения ШМТ1Х, например, когда вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок Cx32 дикого типа или терапевтически полезный белок.

У трансгенных мышей с мутациями, вызывающими ШМТ1Х на фоне НГ, не было обнаруживаемого белка Cx32 в мутантной линии 175fs (27), в то время как у трансгенных мышей R142W, T55I, R75W и N175D мутантный белок удерживался в перинуклеарной области, аналогично паттерну *in vitro* (см. выше), и у них развивалась демиелинизирующая нейропатия, аналогичная таковой у мышей НГ Cx32 (22, 28, 29). В присутствии мутантов R142W, R75W и N175D с удержанием в аппарате Гольджи (но не мутанта T55I с удержанием в ЭР) наблюдалась пониженная экспрессия эндогенного Cx32 ДТ мыши, что указывает на то, что мутанты с удержанием в АГ могут иметь доминантно-отрицательные эффекты на Cx32 ДТ. Это не имеет клинического значения для пациентов с ШМТ1Х, экспрессирующих только по одной аллели GJB1 в каждой клетке, но это необходимо учитывать при планировании генной терапии. Ни один из мутантов, экспрессируемых *in vivo*, не оказывал каких-либо других токсических или доминантных эффектов на другие коэкспрессируемые коннексины (22, 28). С-концевые мутанты C280G и S281X были правильно локализованы и предотвращали демиелинизацию у мышей с НГ Cx32, оставляя неясным, каким образом они вызывают нейропатию у людей (30).

Соответственно, болезнь ШМТ1Х также может быть вызвана доминантно-отрицательными мутациями в белке Сх32. В данном случае специалист поймет, что было бы полезно, чтобы вирусный вектор согласно данному изобретению содержал первую нуклеиновую кислоту, которая транскрибируется в некодирующую РНК, которая сама направлена на иРНК мутантного Сх32 для предотвращения трансляции данного мутантного белка. Специалист поймет, как получить подходящие последовательности нуклеиновой кислоты, которые, например, нацелены на иРНК мутантного Сх32, но не на иРНК Сх32 дикого типа или терапевтически полезную иРНК. Таким образом, в одном варианте осуществления данного изобретения субъекта можно лечить с помощью вирусного вектора, который содержит первую нуклеиновую кислоту, которая транскрибируется в некодирующую РНК, нацеленную на мутант Сх32, и данного субъекта также можно лечить с помощью второго вирусного вектора согласно данному изобретению, при этом указанный второй вирусный вектор содержит вторую нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок Сх32 дикого типа или терапевтически полезный белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные первая и вторая нуклеиновые кислоты могут находиться в одном и том же вирусном векторе согласно данному изобретению. Подобный подход может применяться при лечении или профилактике любого заболевания, связанного со шванновскими клетками, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК геной последовательности гена дикого типа, ассоциированного с нейропатией. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой кДНК геной последовательности гена дикого типа щелевого контакта бета 1 (GJB1), которая, как считается, имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 6 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 6, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 6 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 6. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности ОРС GJB1 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности ОРС GJB1, необязательно – по меньшей мере на 80%, или

на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности ОРС GJB1 или гомологична последовательности ОРС GJB1.

ШМТ1Х вызывается мутациями в гене GJB1, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка Cx32 дикого типа. Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики ШМТ1Х путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена GJB1.

Болезнь Шарко – Мари – Тута типа 4С (ШМТ4С) представляет собой аутосомно-рецессивную наследственную нейропатию, которая, по-видимому, является наиболее распространенной среди общих редких рецессивных демиелинизирующих форм нейропатии ШМТ4, и на нее приходится почти половина всех случаев ШМТ4 (35). ШМТ4С обычно проявляется у пациентов в первое десятилетие жизни деформациями стопы и сколиозом, слабостью, арефлексией и потерей чувствительности (36 - 38). Распространенными проявлениями являются поражение черепных нервов с нарушением слуха, медленными зрачковыми световыми рефлексам и лингвальной фасцикуляцией, и описаны фенотипические вариации у пациентов с идентичными мутациями (39 - 41). Электрофизиологические исследования у пациентов с ШМТ4С подтверждают демиелинизирующий процесс со средней медианной скоростью проводимости двигательного нерва (СПДН), составляющей 22,6 м/с. Результаты биопсии нервов характеризуются увеличением базальных мембран вокруг миелинизированных, демиелинизированных и немиелинизированных аксонов, относительно небольшим числом луковиц и, наиболее часто, большими цитоплазматическими отростками шванновских клеток (36, 37, 42).

Молекулярная генетика ШМТ4С: анализ групп сцепления и картирование гомозиготности (43) привели к открытию локуса данной болезни на хромосоме 5q32 и впоследствии – к первоначальному открытию 11 различных мутаций в гене SH3TC2, в основном усекающих мутаций, но также и миссенс-мутаций (42). По состоянию на настоящее время описано по меньшей мере 28 различных мутаций SH3TC2, и они могут быть более распространены среди определенных этнических групп (44) с вероятными эффектами основателя (39). Длина полного транскрипта кДНК составляет 3864 п. о. SH3TC2 кодирует белок из 1288

аминокислот, содержащий два домена с гомологией Src 3 (SH3) и 10 доменов с тетраатрикопептидными повторами (TPR), не имеющих общего значительного сходства с любым другим белком человека с известной функцией. Присутствие доменов SH3 и TPR предполагает, что SH3TC2 может функционировать в качестве каркасного белка (42). SH3TC2 характеризуется высокой консервативностью среди видов позвоночных, тогда как у беспозвоночных ортологи не были идентифицированы. SH3TC2 присутствует в нескольких компонентах пути эндоцитоза, включая ранние и поздние эндосомы и покрытые клатрином везикулы, близкие к сети транс-Гольджи, и в цитоплазматической мембране. Указанная локализация изменяется при болезни ШМТ4С (45).

В модели ШМТ4С у мышей с НГ *Sh3tc2*^{-/-} периферическая нейропатия имеет раннее начало и прогрессирует с замедлением скорости проводимости двигательных и сенсорных нервов, и с ранним началом гипомиелинизации (46, 47). Данный фенотип прогрессирует с увеличением патологии миелина в возрасте 2 месяцев и 12 месяцев. *Sh3tc2* мыши специфически экспрессируется в шванновских клетках и локализуется на цитоплазматической мембране и в перинуклеарном компартменте эндоцитозного рециклинга, что указывает на возможную функцию в миелинизации и (или) в областях аксоглиальных взаимодействий (48). Ультраструктурный анализ миелина в периферическом нерве мутантных мышей выявил аномальную организацию перехвата Ранвье – фенотип, который был подтвержден при биопсии нерва от пациентов с болезнью ШМТ4С. Данные результаты предполагают роль продукта гена SH3TC2 в миелинизации и целостности перехвата Ранвье (46). Таким образом, мышь *Sh3tc2*^{-/-} воспроизводит все основные особенности болезни ШМТ4С и обеспечивает соответствующую модель для тестирования различных видов терапии.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена белка 2, содержащего домены SH3 и тетраатрикопептидные повторы (SH3TC2). Считается, что ОРС SH3TC2 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 7 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 7, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична

последовательности с SEQ ID NO. 7 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 7. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК SH3TC2 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК SH3TC2, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК SH3TC2 или гомологична последовательности кДНК SH3TC2.

Как обсуждалось выше, болезнь ШМТ4С вызывается мутациями в гене SH3TC2, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка SH3TC2 дикого типа. Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения или профилактики болезни ШМТ4С путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК SH3TC2, например, для увеличения экспрессия SH3TC2 дикого типа.

В другом варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в способах лечения или профилактики других типов аутосомно-доминантной демиелинизирующей болезни ШМТ.

ШМТ1В вызывается мутациями в гене миелинового белка ноль (Mrp), приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка Mrp дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена миелинового белка ноль (MPZ). Считается, что ОРС MPZ имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 9 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 9, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 9 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 9. В других вариантах осуществления данного

изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК MPZ или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК MPZ, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК MPZ или гомологична последовательности кДНК MPZ.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения или профилактики болезни ШМТ1В путем доставки некодирующих РНК, как описано в данном документе, нацеленных на токсические мутантные аллели гена MPZ и вызывая их нокаут, в дополнение к доставке копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена MPZ.

ШМТ1D вызывается мутациями в гене EGR2, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка EGR2 дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена белка 2 раннего ростового ответа (EGR2). Считается, что ОРС EGR2 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 10 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 10, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 10 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 10. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК EGR2 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК EGR2, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК EGR2 или гомологична последовательности кДНК EGR2.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики ШМТ1D путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена EGR2.

В другом варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в способах лечения или профилактики других типов аутосомно-рецессивной демиелинизирующей болезни ШМТ. ШМТ4А вызывается мутациями в гене GDAP1, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка GDAP1 дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1). Считается, что ОРС GDAP1 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 11. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 11 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 11, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 11 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 11. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК GDAP1 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК GDAP1, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК GDAP1 или гомологична последовательности кДНК GDAP1.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики ШМТ4А путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена GDAP1.

ШМТ4D вызывается мутациями в гене NDRG1, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка NDRG1 дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1). Считается, что ОРС NDRG1 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 12. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 12 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 12, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 12 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 12. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК NDRG1 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК NDRG1, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК NDRG1 или гомологична последовательности кДНК NDRG1.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики ШМТ4D путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена NDRG1.

ШМТ4Е вызывается мутациями в гене EGR2, приводящими к недостаточной экспрессии функционального белка EGR2 дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена белка 2 раннего ростового ответа (EGR2). Считается, что ОРС EGR2 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с

SEQ ID NO. 10 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 10, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 10 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 10. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК EGR2 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК EGR2, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК EGR2 или гомологична последовательности кДНК EGR2.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики ШМТ4Е путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена EGR2.

Наследственная компрессионная нейропатия (НКН) связана с мутацией в гене PMP22, приводящей к недостаточной экспрессии функционального белка PMP22 дикого типа.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК последовательности дикого типа гена периферического миелинового белка 22 (PMP22). Считается, что ОРС PMP22 имеет последовательность, определенную в SEQ ID NO. 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 8 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 8, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 8 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 8. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% гомологична последовательности кДНК PMP22 или по меньшей мере на 75% идентична последовательности кДНК PMP22, необязательно – по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или

на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности кДНК РМР22 или гомологична последовательности кДНК РМР22.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики НКН путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена РМР22.

В другом варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может представлять собой ОРС или кДНК другого гена, связанного с демиелинизирующей нейропатией и (или) дисфункцией шванновских клеток. Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться для лечения или профилактики заболеваний, связанных с демиелинизирующей нейропатией и (или) дисфункцией шванновских клеток, путем доставки копии дикого типа или другой терапевтически полезной копии открытой рамки считывания или кДНК гена, связанного с указанным заболеванием.

Болезнь двигательных нейронов (БДН) (также называемая боковым амиотрофическим склерозом) – это нейродегенеративное заболевание со сложным комплексом причин, которые до конца не установлены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, могут применяться для доставки полинуклеотидов, кодирующих трофические факторы (например, нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ, англ. «BDNF»), нейротрофический фактор глиальных клеток (НФГК, англ. «GDNF»), нейротрофин-3 (НТ-3, англ. «NT-3»), фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС, англ. «VEGF»)). Экспрессия таких трофических факторов в целевых клетках считается полезной для регенерации и сохранения двигательных нейронов, подвергающихся стрессу.

Из этого следует, что в некоторых вариантах осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы предназначены для применения в способах лечения или профилактики БДН.

Специалисту будет понятно, что описанная в данном документе форма белков дикого типа или терапевтически полезная форма может быть экспрессирована либо из нуклеотидной

последовательности полного гена, либо всего лишь из последовательности открытой рамки считывания (ОРС), либо всего лишь из последовательности кДНК. Все эти типы последовательностей могут быть легко доступны специалисту из базы данных последовательностей, например, из базы данных GenBank (которая доступна по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый полинуклеотид кодирует и транслируется в первый полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый полинуклеотид кодирует форму белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения форма белка дикого типа используется для замены или дополнения экспрессии мутантной формы того же белка, которая экспрессируется нуждающимся в этом субъектом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый полинуклеотид может кодировать форму дикого типа или терапевтически полезную форму одного или большего числа из следующих белков: коннексин-32 (Cx32); белок 2, содержащий домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); периферический миелиновый белок 22 (PMP22); миелиновый белок ноль (MPZ); белок 2 раннего ростового ответа (EGR2); белок 1, ассоциированный с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); белок 1, регулируемый N-Мус ниже по каскаду (NDRG1). Специалист поймет, что к аминокислотным последовательностям описанных в данном документе белков можно легко получить доступ в базе данных последовательностей, например, в базе данных белков NCBI (которая доступна по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данное изобретение может применяться к способам замены гена путем предоставления вектора AAV, содержащего форму дикого типа или другую терапевтически полезную форму заменяемого гена. В некоторых неограничивающих примерах заменяемый ген может быть мутирован таким образом, что он не кодирует белок, а он кодирует усеченную версию белка дикого типа (например, имеет преждевременный стоп-кодон), он кодирует пониженное количество функционального белка или он кодирует нефункциональную мутантную форму белка.

В дополнительном или альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота кодирует и транслируется в трофический фактор

(например, в нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ), в нейротрофический фактор глиальных клеток (НФГК), в нейротрофин-3 (НТ-3), в фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС). К трофическому фактору авторы данного изобретения относят биомолекулы (например, белки или пептиды), которые поддерживают рост, дифференцировку и (или) развитие развивающихся и зрелых нейронов. В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанный первый полинуклеотид кодирует фактор регенерации (например, ангиогенин, Oct-6, Egr2, Sox-10). В другом дополнительном или альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанный первый полинуклеотид кодирует фактор роста (например, инсулиноподобный фактор роста – ИФР, англ. «IGF»).

Использование векторов, описанных в данном документе, для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих трофические факторы, факторы регенерации и (или) факторы роста, описанные выше, может применяться в некоторых вариантах осуществления данного изобретения для лечения или профилактики приобретенных заболеваний периферических нервов. В одном примере, путем доставки в шванновские клетки и аксоны описанных в данном документе векторов, кодирующих трофические факторы и (или) факторы роста, можно лечить диабетические и другие токсические периферические нейропатии. В другом примере болезнь двигательных нейронов (БДН) (которая также известна как боковой амиотрофический склероз) можно лечить путем доставки векторов, как описано в данном документе, кодирующих трофические факторы, которые могут быть доставлены в аксоны подвергающихся стрессу двигательных нейронов для ретроспективного сохранения указанных двигательных нейронов.

В другом варианте осуществления данного изобретения введение вирусного вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый белок или полипептид, приводит к улучшенному функционированию шванновских клеток и (или) повышенному образованию миелиновой оболочки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное улучшение функции достигается за счет повышения образования миелиновой оболочки шванновскими клетками по сравнению с образованием миелиновой оболочки шванновскими клетками у субъекта до лечения, и указанное улучшение функции может быть выявлено посредством обнаружения повышенной продукции миелиновой оболочки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное улучшение функции можно измерить по улучшению мышечной силы и (или) по улучшенной скорости проводимости в седалищном нерве, и (или) по изменениям

потенциального ответа биомаркеров крови по сравнению с этими показателями у данного субъекта до лечения. Квалифицированный специалист знаком с методиками определения улучшения функции шванновских клеток и (или) повышенного образования миелиновой оболочки. Некоторые из таких методик представлены в примерах.

В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения повышенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками приводит к улучшенной миелинизации периферических нервов. Под термином «улучшенная миелинизация периферических нервов» авторы данного изобретения подразумевают повышение миелинизации периферических нервов по сравнению с таковой у данного субъекта до лечения. Это включает в себя уменьшение количества демиелинизированных и ремиелинизированных волокон и (или) уменьшение количества аномально миелинизированных волокон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения улучшенная миелинизация также может быть связана с уменьшением числа пенистых макрофагов, которые являются маркером воспаления. Улучшенная миелинизация также может быть связана с увеличением толщины миелина и уменьшением g -коэффициентов (диаметр аксона, деленный на диаметр миелинизированного волокна).

Как описано выше, указанная первая нуклеиновая кислота может кодировать полипептид или белок, который обладает терапевтическими преимуществами, например, когда нативный белок мутирован или экспрессируется на уровне, который слишком низок для обеспечения нормальной функциональности.

Следует понимать, что в альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота может быть транскрибирована в РНК, которая не представляет собой иРНК, т. е. не представляет собой РНК, которая транслируется в белок. В соответствии с этим, указанная первая нуклеиновая кислота может быть транскрибирована в некодирующую РНК.

Под термином «некодирующая РНК» авторы данного изобретения подразумевают любую молекулу РНК, которая не транслируется в полипептид или белок. Специалист знает о таких полимерах РНК и о том, как их можно использовать для воздействия на экспрессию полипептидов. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота транскрибируется в некодирующую микроРНК (англ. «miRNA»). В следующем дополнительном альтернативном варианте осуществления данного

изобретения указанная первая нуклеиновая кислота транскрибируется в короткую шпилечную РНК (кшРНК, англ. «shRNA»). В дополнительном варианте осуществления данного изобретения указанная первая нуклеиновая кислота транскрибируется в гидовую РНК (гРНК, англ. «gRNA»), например, как часть системы на основе CRISPR.

Экспрессия некодирующей РНК, описанной выше, когда вирусный вектор находится в целевом организме, может привести к снижению экспрессии целевого полинуклеотида, необязательно при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой ген, расположенный в целевом организме, необязательно при этом он расположен в клетке в целевом организме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевой полинуклеотид представляет собой последовательность гена. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе изобретение можно применять для нокдауна экспрессии целевого гена. Под термином «нокдаун» в данном контексте авторы данного документа подразумевают, что экспрессия целевого гена снижена по сравнению с уровнями экспрессии до обработки вирусным вектором.

Например, данное изобретение можно применять в ситуациях, когда целевая нуклеиновая кислота, например, целевой ген, сверхэкспрессируется. Указанный вирусный вектор можно применять для доставки первой нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в некодирующую РНК, например, для нацеливания иРНК, продуцируемой геном, который сверхэкспрессируется, на деградацию (например, на деградацию комплексом RISC, что хорошо известно в данной области техники) или для прямого блокирования трансляции указанной иРНК в белок. Данный вариант осуществления данного изобретения также применим к ситуациям, в которых целевая нуклеиновая кислота сама транскрибируется в некодирующую РНК, и полезно снизить уровни указанной некодирующей РНК хозяина в данной клетке.

Данный вариант осуществления данного изобретения также можно применять для нацеливания на вредные мутанты с приобретением функции и для снижения уровней экспрессии их белка или иРНК.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия некодирующей РНК приводит к снижению экспрессии целевой нуклеиновой кислоты, полинуклеотида или гена. В одном варианте осуществления данного изобретения экспрессия или сверхэкспрессия целевого полинуклеотида в целевом организме

рассматривается как ассоциированная с заболеванием, связанным со шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой доминантную демиелинизирующую нейропатию (ШМТ1), необязательно при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой мутированную аллель миелинового белка ноль (Mrz/P0) и указанное заболевание, связанное со шванновскими клетками, представляет собой ШМТ1В, или при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой другой доминантный ген, ассоциированный с ШМТ1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение вирусного вектора, кодирующего первую нуклеиновую кислоту, приводит к экспрессии некодирующей РНК, что приводит к улучшенному функционированию шванновских клеток. Как обсуждалось выше, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное улучшение функции достигается за счет повышения образования миелиновой оболочки шванновскими клетками по сравнению с образованием миелиновой оболочки шванновскими клетками у данного субъекта до лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное улучшение функции можно измерить по улучшению мышечной силы и (или) по улучшенной скорости проводимости в седалищном нерве, и (или) по изменениям потенциального ответа биомаркеров крови по сравнению с этими показателями у данного субъекта до лечения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, содержат первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первый полипептид или белок, и указанный вектор может также содержать вторую нуклеиновую кислоту, которая транскрибируется в некодирующую РНК. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данное изобретение можно применять для подавления экспрессии мутантного гена с использованием некодирующей РНК, а также для замены мутантного гена копией указанного гена дикого типа, что приводит к полной замене гена. Этот подход считается особенно полезным, когда у субъекта, нуждающегося в терапии, имеется мутация с приобретением функции в конкретном белке.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор также содержит вторую или третью последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фактор транскрипции, способный управлять экспрессией или повышать экспрессию от специфичного в отношении шванновских клеток промотора, необязательно

– от специфичного в отношении миелина промотора или от минимальных специфичных в отношении миелина промоторов, как определено в данном документе. Примеры таких факторов транскрипции, которые могут управлять экспрессией полинуклеотидов под контролем промоторов, специфичных в отношении шванновских клеток, включают в себя Egr2 и Sox10.

Указанный вирусный вектор может также содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид Cas9 или аналогичный ему полипептид, который обычно применяется в методах CRISPR и их вариациях, такой как белок Cas9 с инактивированной активностью.

Следует понимать, что описанные в данном документе вирусные векторы можно вводить субъекту различными способами. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы вводят путем интратекальной инъекции. Под термином «интратекальная инъекция» авторы данного изобретения подразумевают инъекцию в позвоночный канал, в результате которой введенный материал достигает спинномозговой жидкости (СМЖ, англ. «CSF»). В особенно предпочтительном варианте осуществления данного изобретения описанные в данном документе вирусные векторы вводят с помощью интратекальной инъекции в поясничный отдел. Описанные в данном документе вирусные векторы также подходят для введения с помощью интратекальной инъекции в грудной отдел или с помощью интратекальной инъекции в шейный отдел. В качестве альтернативы описанные в данном документе вирусные векторы можно вводить с помощью прямой инъекции в периферические нервы. В качестве альтернативы описанные в данном документе вирусные векторы можно вводить с помощью прямой внутривенной инъекции.

Интратекальная инъекция обеспечивает преимущества перед другими способами введения, такими как интраневральная инъекция и внутривенная инъекция. По сравнению с интраневральной инъекцией, интратекальная инъекция обеспечивает более широкое распространение на множественные корешки спинного мозга и нервы. Напротив, интраневральная инъекция обеспечивает распределение только внутри того нерва, в который была произведена данная инъекция. Кроме того, интратекальная инъекция может проводиться в медицинском учреждении в обычном порядке, не требует хирургической процедуры и считается безопасной, в то время как интраневральные инъекции требуют

хирургической процедуры и обнажения нескольких нервов, имеют более высокий риск, поэтому их гораздо сложнее внедрить в клиническую практику.

Несмотря на то, что внутривенную инъекцию легче осуществлять в медицинском учреждении, она имеет недостаток, заключающийся в том, что для доставки в нервную систему требуются гораздо более высокие дозы вектора по сравнению с интратекальной доставкой. Внутривенная доставка также может привести к большей токсичности из-за более высоких доз вируса и риска гепатотоксичности. Кроме того, внутривенная инъекция может вызвать больше иммунных реакций, тогда как интратекальная доставка дает возможность уклониться от иммунной системы с более низким иммунным ответом.

После того, как векторы AAV, описанные в данном документе, трансдуцировали целевую клетку, доставляемый генетический материал остается стабильным и эпизомальным при условии, что данная целевая клетка дифференцировалась и не делится, как в случае со зрелыми шванновскими клетками. Следовательно, однократного введения вектора AAV должно быть достаточно для достижения терапевтических эффектов, и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, вводят с помощью однократной интратекальной инъекции. Тем не менее, в некоторых случаях может потребоваться введение субъекту нескольких доз различных векторов AAV в разные моменты времени. Указанные различные векторы могут экспрессировать разные первые полинуклеотиды или могут экспрессировать один и тот же первый полинуклеотид, и отличаться типом используемого AAV. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения вирусные векторы, описанные в данном документе, могут быть полезны для лечения или профилактики заболеваний, связанных со шванновскими клетками, которые ассоциированы со множеством различных генов.

Следует понимать, что описанные в данном документе вирусные векторы подходят для применения у человека. Указанные вирусные векторы также подходят для применения у млекопитающих в целом, таких как кошка, собака, мышь, кролик, лошадь. Указанных субъектов можно лечить вирусными векторами, описанными в данном документе, либо до появления симптомов заболевания, связанного со шванновскими клетками, либо после появления симптомов указанного заболевания. Проходящие лечение субъекты могут быть любого возраста в начале лечения. Например, субъекта можно лечить вектором (-ами) согласно данному изобретению, как только будет подтверждено, что у данного субъекта

есть мутация или другое нарушение, снижающее эффективность функционирования шванновских клеток. Это может осуществляться до того, как проявятся какие-либо симптомы.

Следует понимать, что доза применяемого вирусного вектора будет корректироваться в соответствии с потребностями нуждающегося в этом субъекта, например, она может корректироваться в зависимости от возраста, массы тела или роста субъекта. В качестве общего примера, может применяться следующая доза (для интратекального введения): возрастающие дозы в $3,5 \times 10^{13}$ векторных геномов (вг), $3,3 \times$ более высокая доза в $1,2 \times 10^{14}$ вг, и в 5 раз более высокая доза в $1,8 \times 10^{14}$ вг. Такие дозы ранее применяли в клинических испытаниях с использованием AAV (например, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02362438>), и специалисту будет известно, что они могут быть применены к данному изобретению.

Специалисту будет понятно, что в дополнение к терапевтическим способам профилактики или лечения заболевания, связанного со шванновскими клетками, в данном изобретении также представлен вирусный вектор как таковой. Соответственно, в другом аспекте в данном изобретении представлен описанный в данном документе вирусный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, как определено в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор представляет собой AAV. В особенно предпочтительном варианте осуществления данного изобретения AAV представляет собой AAV9. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта описаны в другой части данного документа, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен минимальный специфичный в отношении миелина промотор, включающий в себя или состоящий из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 5, или последовательности, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или гомологична последовательности

с SEQ ID NO. 5. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен минимальный специфичный в отношении миелина промотор, включающий в себя или состоящий из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 22, или последовательности, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 22 или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 22 или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 22. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к минимальному специфичному в отношении миелина промотору человека, при этом указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор человека имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 22 или идентична последовательности с SEQ ID NO. 22.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлена полинуклеотидная конструкция, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая представляет собой специфичный в отношении шванновских клеток промотор, необязательно, которая представляет собой специфичный в отношении миелина промотор, необязательно содержащая промотор миелинового белка ноль (Mrp) или минимальный специфичный в отношении миелина промотор, как определено в данном документе, функционально связанную со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в первый полинуклеотид, при этом указанная вторая нуклеиновая кислота:

а) представляет собой открытую рамку считывания или кДНК, или другие элементы гена; или б) транскрибируется в некодирующую РНК.

Данное изобретение также относится к вирусному вектору, содержащему такую полинуклеотидную конструкцию, например, к вектору AAV, содержащему указанную конструкцию. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения полинуклеотидная конструкция согласно данному изобретению содержит специфичный в отношении шванновских клеток промотор, при этом указанный промотор представляет собой: а) минимальный специфичный в отношении шванновских клеток промотор, необязательно, который представляет собой минимальный промотор Mrpz, как описано в данном документе, например, при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22; или б) полноразмерный промотор Mrpz, необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18.

Предпочтительно, полинуклеотидная конструкция согласно данному изобретению содержит минимальный промотор Mrpz человека или полноразмерный промотор Mrpz человека, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлены следующие вирусные векторы:

а) вектор AAV - Mrpz.Egfp, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mrpz) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 1), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или

на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18;

b) вектор AAV9 - Mpz - GJB1, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mpz) и открытую рамку считывания (OPC) гена щелевого контакта бета 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 2), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18;

c) вектор AAV9 - miniMpz.Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMpz) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 3), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22;

d) вектор AAV9 - Mpz человека - GJB1, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена щелевого контакта бета 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 17);

e) вектор AAV9 - Mpz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 19);

f) вектор AAV9 - miniMpz - SH3TC2.myc.ITR, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMpz) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 20);

g) вектор AAV9 - miniMpz человека - SH3TC2, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 21);

h) вектор AAV9 - miniMpz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 23); или) AAV, необязательно при этом указанный вектор AAV представляет собой AAV9.

Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты,

промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В одном конкретном варианте осуществления в данном изобретении также представлен вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, у нуждающегося в этом субъекта, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в первый полинуклеотид, и при этом транскрипция указанной первой нуклеиновой кислоты находится под контролем минимального специфичного в отношении миелина промотора, который необязательно включает в себя или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 5 или в SEQ ID NO. 22, или последовательности, которая по меньшей мере на 75% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или которая по меньшей мере на 75% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22. В одном варианте осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор может представлять собой вектор AAV. В другом альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанный вирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В другом аспекте в данном изобретении также представлены фармацевтические композиции, содержащие любой из вирусных векторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная фармацевтическая композиция содержит соответствующее количество указанного вирусного вектора и дополнительно включает в себя фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель, носитель, буфер или адъювант. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» означает терапевтически эффективный состав для применения в лечении или профилактике заболеваний, связанных со шванновскими клетками.

Фармацевтические композиции, которые достаточно стабильны при хранении и пригодны для введения человеку, могут быть изготовлены известным в данной области техники способом.

Под «фармацевтически приемлемым» авторы данного изобретения подразумевают нетоксичное вещество, которое не снижает эффективность биологической активности активных ингредиентов, т. е. указанного вирусного вектора. Такие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты хорошо известны в данной области техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990), и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000), которые включены в данный документ посредством ссылки).

Термин «буфер» предназначен для обозначения водного раствора, содержащего кислотно-щелочную смесь, который предназначен для стабилизации pH. Примерами буферов являются Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, фосфат, карбонат, ацетат, цитрат, гликолят, лактат, борат, ACES, ADA, тартрат, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, какодилат, CHES, DIPSO, EPPS, этаноламин, глицин, HEPPSO, имидазол, имидазолектиновая кислота, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO и TES.

Термин «разбавитель» служит для обозначения водного или неводного раствора, предназначенного для разбавления указанного вирусного вектора в указанном фармацевтическом препарате. Разбавитель может представлять собой один или большее число из следующего: физиологический раствор, вода, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, этанол или масла (такие как сафлоровое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло или кунжутное масло).

Термин «адъювант» предназначен для обозначения любого соединения, добавляемого в композицию для усиления биологического действия указанного вирусного вектора. Адъювант может представлять собой один или большее число из следующего: коллоидное

серебро, соли цинка, меди или серебра с различными анионами, такие как, но не ограничиваясь ими, фторид, хлорид, бромид, йодид, тиоцианат, сульфит, гидроксид, фосфат, карбонат, лактат, гликолят, цитрат, борат, тартрат и ацетаты разного ацильного состава. Адьювантом могут также быть катионные полимеры, такие как РНМВ, простые катионные эфиры целлюлозы, сложные катионные эфиры целлюлозы, деацелированная гиалуроновая кислота, хитозан, катионные дендримеры, катионные синтетические полимеры, такие как поли(винилимидазол), и катионные полипептиды, такие как полигистидин, полилизин, полиаргинин и пептиды, содержащие эти аминокислоты.

Экспциент может представлять собой один или большее число из углеводов, полимеров, липидов и минералов. Примеры углеводов включают в себя лактозу, сахарозу, маннитол и циклодекстрины, которые добавляют в композицию, например, для облегчения лиофилизации. Примерами полимеров являются крахмал, простые эфиры целлюлозы, целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, этилцеллюлоза, метилцеллюлоза, пропилцеллюлоза, альгинаты, каррагинаны, гиалуроновая кислота и ее производные, полиакриловая кислота, полисульфонат, полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, сополимеры полиэтиленоксида/полипропиленоксида, поливинилалкоголь/поливинилацетат различной степени гидролиза, полимолочная кислота, полигликолевая кислота или их сополимеры различного состава, и поливинилпирролидон – все с разной молекулярной массой, которые добавляют в композицию, например, для регулирования вязкости, для достижения биоадгезии или для защиты активного ингредиента от химического и протеолитического распада. Примерами липидов являются жирные кислоты, фосфолипиды, моно-, ди- и триглицериды, церамиды, сфинголипиды и гликолипиды – все с разной длиной ацильной цепи и насыщенностью, яичный лецитин, соевый лецитин, гидрогенизированный яичный и соевый лецитин, которые добавляют в композицию по причинам, аналогичным причинам добавления полимеров. Примерами минералов являются тальк, оксид магния, оксид цинка и оксид титана, которые добавляют в композицию для получения таких преимуществ, как уменьшение накопления жидкости или выгодные пигментные свойства.

В другом аспекте в данном изобретении представлено применение описанного в данном документе вирусного вектора в способе производства медицинского препарата для лечения или профилактики заболевания, связанного со шванновскими клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное заболевание вызывает

разрушение и (или) снижение образования миелиновой оболочки шванновскими клетками. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В еще одном аспекте в данном изобретении представлены способы лечения или профилактики заболевания, связанного со шванновскими клетками, с применением любого из вирусных векторов, описанных в данном документе. В конкретном варианте осуществления в данном изобретении представлены способы лечения или профилактики болезни Шарко – Мари – Тута. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1X или типа 4C. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

Специалист поймет, что описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в системе CRISPR/Cas для использования при редактировании гена или подавлении гена, например, путем применения полипептида с инактивированной активностью Cas9. Соответственно, в другом аспекте данное изобретение включает в себя вирусный вектор или полинуклеотидную конструкцию, как описано в данном документе, для применения в системе CRISPR/Cas9, содержащей любой один или большее число из следующего:

- a) полинуклеотид, кодирующий единую гидовую РНК (егРНК, англ. «sgRNA»), нацеленную на представляющий интерес ген;
- b) полинуклеотид, кодирующий полипептид Cas9;
- c) полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид.

Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты,

промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

Специалисту будет понятно, что описанные в данном документе вирусные векторы могут иметь множество применений, кроме лечения или профилактики заболеваний, связанных со шванновскими клетками. Например, описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в способе мечения шванновских клеток, например, флуоресцентным белком, например, зеленым флуоресцентным белком (GFP) или усиленным зеленым флуоресцентным белком (EGFP), или другими нефлуоресцентными репортерами. В некоторых примерах мечение шванновских клеток может применяться в способе диагностики заболевания, связанного со шванновскими клетками.

Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В другом примере описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в способах индукции дифференцировки шванновских клеток в альтернативные типы клеток, например, в нейроны, олигодендрциты или астроциты.

В еще одном примере описанные в данном документе вирусные векторы могут применяться в способах стимуляции шванновских клеток для поддержания регенерации у субъекта, нуждающегося в этом, например, после повреждения или травмы. Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В еще одном примере описанные в данном документе вирусные векторы могут быть пригодными для применения в способах лечения *ex vivo* заболеваний, связанных со шванновскими клетками. Например, клетки-мишени могут быть удалены у субъекта, нуждающегося в лечении, и трансдуцированы вирусным вектором, как описано в данном документе, перед введением обратно данному субъекту.

Предпочтения в отношении признаков данного аспекта являются такими, как определено в данном документе, например, предпочтения в отношении вектора, нуклеиновой кислоты, промотора, заболевания, связанного со шванновскими клетками, являются такими, как определено в данном документе.

В данном изобретении также представлена клетка, трансдуцированная вирусным вектором согласно данному изобретению, например, шванновская клетка.

В данном изобретении также представлена клетка, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, которая включает в себя соответствующий промотор и первую нуклеиновую кислоту. Специалисту будет известно, что вирусные векторы согласно данному изобретению можно продуцировать в культивируемых клетках, предпочтительно – в клетках НЕК293, например так, как описано в (58).

Следует принимать во внимание, что векторы и способы, описанные в данном документе, могут быть реализованы *in vivo*, но также могут применяться *ex vivo* или *in vitro*, например, клетки, такие как шванновские клетки, могут быть трансдуцированы *in vitro* или *ex vivo* для последующих терапевтических или исследовательских целей.

В данном изобретении также представлены наборы, которые можно применять для реализации на практике любого из описанных в данном документе вирусных векторов. Например, в данном изобретении представлен набор для применения с вирусным вектором или полинуклеотидом согласно любому из предшествующих пунктов, при этом указанный набор включает в себя одно или большее число из следующего:

- a) вирусный вектор, как определено в данном документе;
- b) полинуклеотидную конструкцию, как определено в данном документе;
- c) вирусный вектор;
- d) вирусный вектор, содержащий полинуклеотидную конструкцию, как определено в данном документе;
- e) фармацевтически приемлемый носитель и (или) эксципиент;
- f) одноразовый шприц, например, одноразовый шприц, подходящий для интратекальной инъекции в поясничный отдел;
- g) инструкцию по применению.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанный набор включает в себя больше, чем один вирусный вектор согласно данному изобретению, например, указанный набор может включать в себя два разных вирусных вектора, как определено в данном документе.

Специалисту будет понятно, что при любом терапевтическом применении данного изобретения субъекту можно вводить больше чем один вирусный вектор согласно данному изобретению. Специалисту будет понятно, что в некоторых ситуациях это выгодно, например, когда известно, что с заболеванием, связанным со шванновскими клетками, ассоциирован больше чем один ген, тогда можно вводить несколько вирусных векторов, при этом каждый вектор направлен на экспрессию различного терапевтического белка. В качестве альтернативы, один вектор может экспрессировать больше чем один терапевтический белок или больше чем одну некодирующую РНК. В других ситуациях, таких как описанные выше, один вирусный вектор может быть использован для экспрессии, например, белка Cas9 в шванновских клетках, а другой вирусный вектор может быть использован для экспрессии соответствующей гРНК для нацеливания Cas9 на требуемую нуклеиновую кислоту.

В данном документе перечисление или обсуждение явно ранее опубликованного документа не следует обязательно понимать как признание того, что такой документ является частью известного уровня техники или общих знаний.

Предпочтения и варианты для конкретного аспекта, признака или параметра данного изобретения, если контекст не указывает иное, должны рассматриваться как раскрытые в сочетании с любыми и всеми предпочтениями и вариантами для всех других аспектов, признаков и параметров данного изобретения.

В соответствии с этим, и для иллюстрации того, как описание одного аспекта данного изобретения связано с другими аспектами данного изобретения, и для демонстрации того, как эти аспекты могут быть объединены, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлены:

вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV и

при этом указанный вирусный вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, при этом экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем минимального специфичного в отношении миелина промотора (Mpz);

вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV и при этом указанный вирусный вектор содержит первую нуклеиновую кислоту, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, при этом экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем: а) промотора миелинового белка ноль (Mpz), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 1, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 1; или

б) минимального специфичного в отношении миелина промотора (miniMpz), который включает в себя или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 5 или в SEQ ID NO. 22), необязательно при этом указанный промотор miniMPZ имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или в SEQ ID NO. 22;

полинуклеотидная конструкция, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая представляет собой минимальный специфичный в отношении миелина промотор (Mpz), который функционально связан со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, при этом указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой открытую рамку считывания последовательности гена или кодирует некодирующую РНК;

минимальный специфичный в отношении миелина промотор (Mpz), который стимулирует высокие уровни экспрессии в шванновских клетках и подходит для применения в вирусных векторах, описанных в данном документе.

В данном изобретении также представлены:

вирусный вектор для применения в лечении или профилактике ШМТ1Х, при этом указанный вектор содержит промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 18), функционально связанный с геном GJB1, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9;

применение вирусного вектора в способе производства медицинского препарата для лечения или профилактики ШМТ1Х, при этом указанный вектор содержит промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 18), функционально связанный с геном GJB1, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9; и

способ лечения или профилактики ШМТ1Х, при этом указанный способ включает в себя введение вирусного вектора пациенту, нуждающемуся в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 18), функционально связанный с геном GJB1, и при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9.

В данном изобретении также представлены:

вирусный вектор для применения в лечении или профилактике ШМТ4С, при этом указанный вектор содержит минимальный промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 22), функционально связанный с геном SH3TC2, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9;

применение вирусного вектора в способе производства медицинского препарата для лечения или профилактики ШМТ4С, при этом указанный вектор содержит промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 22), функционально связанный с геном SH3TC2, при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9; и

способ лечения или профилактики ШМТ4С, при этом указанный способ включает в себя введение вирусного вектора пациенту, нуждающемуся в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит промотор Mrz человека (в соответствии с SEQ ID NO: 22), функционально связанный с геном SH3TC2, и при этом указанный вирусный вектор представляет собой AAV9.

Пациент, нуждающийся в этом, включает в себя пациента, у которого проявлялись симптомы или которому иным образом был поставлен диагноз одного из заболеваний, указанных в данном документе, а также включает в себя пациента, у которого предполагается или разовьется одно из заболеваний, указанных в данном документе.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Плазмиды для переноса вектора AAV, сконструированные для экспрессии гена, нацеленного на шванновские клетки. Вектор pAAV-Mbz.GJB1, содержащий открытую рамку считывания GJB1 человека, экспрессирующий ген Cx32 (полный), и pAAV - Mrz.Egfr, экспрессирующий репортерный ген EGFP (контроль).

Фиг. 2. AAV9-опосредованная экспрессия гена, нацеленного на шванновские клетки. A-D: через четыре недели после интратекальной инъекции (и/т) в поясничный отдел вектора AAV9 - Mrz - Egfr мышам дикого типа (ДТ) в возрасте 2 месяцев, иммуноокрашивание срезов поясничного корешка (А-В) антителами к EGFP (А2, В) показывает перинуклеарную экспрессию (звездочки) в подмножестве шванновских клеток при малом (слева) и большом (справа) увеличении. Экспрессия EGFP также видна в срезе седалищного нерва при малом увеличении без окрашивания антителами (С2) и при большом увеличении в поврежденных волокнах седалищного нерва, иммуноокрашенных антителом к EGFP (D2). А1, С1 и D1 показывают только ядерное окрашивание с помощью DAPI тех же областей, которые показаны на А2, С2, D2. Е: количественное определение процентного содержания EGFP-положительных шванновских клеток в поясничных корешках и седалищных нервах. F: число копий вектора (ЧКВ) в поясничных корешках, проксимальных и дистальных отделах седалищных нервов демонстрирует градиент биораспределения вектора в направлении периферических нервов после интратекальной инъекции. G: анализ методом иммуноблота лизатов поясничных корешков (ПК), бедренных нервов (БН) и седалищных нервов (СН) от разных мышей (1-4) показывает специфическую полосу, специфичную для EGFP, в большей части тканей мышей, получивших инъекцию, что соответствует положительному контролю (+) из трансгенного образца, в то время как данная полоса отсутствует в отрицательном (-) контроле (Kagiava et al., не опубликовано).

Фиг. 3: экспрессия вектора AAV9 - Mrz.GJB1, доставленного интратекально, у двухмесячных мышей с НГ Cx32 и R75W. А. Число копий вектора (ЧКВ) в соответствующих тканях. Иммуноокрашивание волокон расщепленного седалищного нерва ДТ (В) и НГ Cx32 (С) демонстрирует специфическую локализацию Cx32 в паранодальных миелиновых областях в волокне ДТ (стрелки), которая отсутствует в НГ Cx32. Инъекция и/т вектора AAV9 - Mrz.GJB1 приводит к паранодальной экспрессии Cx32 не только в волокнах седалищного нерва НГ Cx32 (D), но также и в волокнах НГ R75W (E), несмотря на присутствие мутанта R75W в перинуклеарных областях (звездочка и пустые стрелки). F: анализ методом вестерн-блота экспрессии Cx32 в образцах поясничных

корешков и седалищного нерва (ТГ+: трансгенный положительный контроль; НГ: необработанный НГ Сх32 – отрицательный контроль) (Kagiava et al., не опубликовано).

Фиг. 4: анализ поведения мышей НГ Сх32, получавших инъекции вектора AAV9 - Mrz.GJB1 (полного) после начала заболевания, в возрасте 6 месяцев, по сравнению с мышами из того же помета, получавшими AAV9 - Mrz.Egfp (контрольный вектор). Результаты исследования двигательных способностей на основании теста ротарод (слева) и теста хвата задней конечности (справа) у мышей, на которых воздействовали вектором AAV9 - Mrz.GJB1 (GJB1), по сравнению с мышами НГ Сх32, на которых воздействовали контрольным вектором, как указано. Анализ с течением времени для каждой группы показал улучшение двигательных способностей мышей НГ Сх32, на которых воздействовали полным вектором, в тесте ротарод и в тесте хвата задней конечности через 2 месяца после инъекций (в возрасте 8 месяцев), а затем двигательные способности оставались стабильными до возраста 10 месяцев. Напротив, у мышей, на которых воздействовали контрольным вектором, не наблюдалось улучшения со временем, как показали оба поведенческих теста.

Фиг. 5: результаты исследований проводимости седалищного двигательного нерва. Скорости проводимости двигательного нерва (СПДН) улучшились у мышей НГ Сх32 в возрасте 10 месяцев, на которых воздействовали полным вектором, по сравнению с мышами из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором, и приблизились к значениям для ДТ.

Фиг. 6: морфологический анализ передних корешков спинного мозга мышей НГ Сх32 после интратекальной доставки AAV9 - Mrz.GJB1 после начала заболевания по сравнению с мышами, на которых воздействовали контрольным вектором. Репрезентативные изображения полутонких срезов передних поясничных корешков, прикрепленных к спинному мозгу, при малом (А-В) и большом (С-Д) увеличении, а также результаты морфометрического анализа (Е-Ф) образцов от мышей, на которых воздействовали контрольным или полным (GJB1) вектором, как указано, в возрасте 10 месяцев (через 4 месяца после воздействия). Корешки мышей, которым вводили AAV9 - Mrz.GJB1 (В, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с корешками мышей из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором (А, С), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (r) волокон. Количественная оценка соотношений аномально миелинизированных волокон в

нескольких корешках подтверждает значительное улучшение количества аномально миелинизированных волокон (E), а также значительное снижение числа пенистых макрофагов (F) у мышей, на которых воздействовали полным вектором, по сравнению с мышами из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором.

Фиг. 7: морфологический анализ седалищных нервов мышей НГ Сх32 после интратекальной доставки вектора AAV9 - Mrz.GJB1 после начала заболевания.

Репрезентативные изображения полутонких срезов седалищных нервов при малом (A-B) и большом (C-D) увеличении, а также результаты морфометрического анализа (E-F) образцов от мышей, на которых воздействовали контрольным или полным (GJB1) вектором, как указано, в возрасте 10 месяцев (через 4 месяца после воздействия). Нервы мышей, которым вводили AAV9 - Mrz.GJB1 (B, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с нервами мышей из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором (A, C), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (r) волокон. Количественная оценка соотношений аномально миелинизированных волокон в нескольких нервах подтверждает значительное улучшение количества аномально миелинизированных волокон (E), а также значительное снижение числа пенистых макрофагов (F) у мышей, на которых воздействовали полным вектором, по сравнению с мышами из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором.

Фиг. 8: морфологический анализ бедренных нервов мышей НГ Сх32 после интратекальной доставки вектора AAV9 - Mrz.GJB1 после начала заболевания.

Репрезентативные изображения полутонких срезов бедренных нервов при малом (A-B) и большом (C-D) увеличении, а также результаты морфометрического анализа (E-F) образцов от мышей, на которых воздействовали контрольным или полным (GJB1) вектором, как указано, в возрасте 10 месяцев (через 4 месяца после воздействия). Нервы мышей, которым вводили AAV9 - Mrz.GJB1 (B, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с нервами мышей из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором (A, C), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (r) волокон. Количественная оценка соотношений аномально миелинизированных волокон в нескольких нервах подтверждает значительное улучшение количества аномально миелинизированных волокон (E), а также значительное снижение числа пенистых макрофагов (F) у мышей, на которых воздействовали полным вектором, по сравнению с мышами из того же помета, на которых воздействовали контрольным вектором.

Фиг. 9: конструкция miniMrz - Egfp, клонированная в плазмиду для переноса AAV после ПЦР-амплификации последовательности длиной 410 п. о. из полноразмерного промотора Mrz крысы длиной 1127 п. о.

Фиг. 10: иммуноокрашивание срезов поясничных корешков и продольных срезов седалищных нервов через 4 недели после интратекальной инъекции в поясничный отдел вектора AAV9 - miniMrz - Egfp мышам ДТ в возрасте 2 месяцев антителом к EGFP демонстрирует перинуклеарную экспрессию в субпопуляции шванновских клеток (А, С). В и С – отрицательные контроли, показывающие только ядерное окрашивание с помощью DAPI. Е: процент EGFP-положительных шванновских клеток (n = 5 - 6 мышей). F: число копий вектора в поясничных корешках и седалищных нервах демонстрирует достаточное биораспределение указанного вектора после интратекальной инъекции (n = 6 мышей).

Фиг. 11: минимальная экспрессия в ЦНС вектора AAV9 - miniMrz - Egfp. Иммуноокрашивание продольных срезов поясничного спинного мозга через 4 недели после интратекальной инъекции в поясничный отдел вектора AAV9 - miniMrz - Egfp мышам ДТ в возрасте 2 месяцев антителом к EGFP в комбинации с клеточными маркерами NeuN (А, мечение нейронов), GFAP (В, мечение астроцитов), CC-1 (С-Д, мечение олигодендроцитов) показывает, что только несколько клеток каждого типа экспрессируют EGFP (примеры указаны стрелками), в то время как большинство из них являются EGFP-отрицательными (примеры указаны открытыми стрелками). Е: количественная оценка у n = 3 - 5 мышей на одно окрашивание клеточным маркером показывает низкие уровни экспрессии во всех трех типах клеток ЦНС, составляющие около 2% - 3%.

Фиг. 12: поведенческое исследование двигательных способностей в группах мышей НГ Sx32 (модель ШМТ1Х), получавших до начала заболевания в возрасте 2 месяцев либо полный терапевтический вектор (AAV9 - Mrz - GJB1), либо контрольный вектор (AAV9 - Mrz - Egfp). Исследование силы хвата задней конечности проводилось до воздействия (в возрасте 2 месяцев) и в возрасте 4 месяцев (фиг. 12А) и 6 месяцев (фиг. 12В). Наблюдается значительное функциональное улучшение в группах, получавших полный вектор, через 4 и 6 месяцев. На фиг. 12С показано значительное улучшение со временем после лечения, тогда как у мышей, получавших контрольный вектор, никаких улучшений не наблюдалось.

Фиг. 13: электрофизиологические исследования мышей НГ Sx32 в возрасте 6 месяцев, получавших до начала заболевания полный вектор и контрольный вектор.

Исследования проводимости седалищного двигательного нерва проводились у мышей в возрасте 6 месяцев и показали значительное улучшение скорости проводимости в седалищном нерве после генной терапии, проведенной в возрасте 2 месяцев, по сравнению с имитацией терапии.

Фиг. 14: морфологический анализ передних (двигательных) поясничных корешков мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших до начала заболевания в возрасте 2 месяцев либо полный терапевтический вектор (AAV9 - Mpz - GJB1), либо контрольный вектор (AAV9 - Mpz - Egfp). Репрезентативные изображения полутонких срезов передних (двигательных) поясничных корешков. Мыши, получавшие AAV9 - Mpz - GJB1 (B, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор (A, C), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (г) волокон. Как подтверждено с помощью количественного анализа (E, F), у мышей, получавших терапевтический вектор, было обнаружено меньшее число демиелинизированных (*) или ремиелинизированных (г) волокон (E) и меньшее число пенистых макрофагов (F) по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор.

Фиг. 15: морфологический анализ средне-седалищных нервов мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших до начала заболевания в возрасте 2 месяцев либо полный терапевтический вектор (AAV9 - Mpz - GJB1), либо контрольный вектор (AAV9 - Mpz - Egfp). Репрезентативные изображения полутонких срезов средне-седалищных нервов. Мыши, получавшие AAV9 - Mpz - GJB1 (B, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор (A, C), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (г) волокон. Как подтверждено с помощью количественного анализа (E, F), у мышей, получавших терапевтический вектор, было обнаружено меньшее число демиелинизированных (*) или ремиелинизированных (г) волокон (E) и меньшее число пенистых макрофагов (F) по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор.

Фиг. 16: морфологический анализ бедренных двигательных нервов мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших до начала заболевания в возрасте 2 месяцев либо полный терапевтический вектор (AAV9 - Mpz - GJB1), либо контрольный вектор (AAV9 - Mpz - Egfp). Репрезентативные изображения полутонких срезов бедренных двигательных нервов. Мыши, получавшие AAV9 - Mpz - GJB1 (B, D), демонстрируют улучшенную миелинизацию по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор

(А, С), с меньшим числом демиелинизированных (*) и ремиелинизированных (г) волокон. Как подтверждено с помощью количественного анализа (Е, F), у мышей, получавших терапевтический вектор, было обнаружено меньшее число демиелинизированных (*) или ремиелинизированных (г) волокон (Е) и меньшее число пенистых макрофагов (F) по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор.

Фиг. 17: анализ экспрессии SH3TC2 в периферической нервной системе мышей Sh3tc2-/- после интратекальной доставки нового терапевтического вектора AAV9 - mini-Mpz - SH3TC2.myc. Экспрессия нормального белка SH3TC2 человека (красный) в основном в перинуклеарной цитоплазме миелинизирующих шванновских клеток в поясничных корешках (А) и седалищных нервах (срез на D и расщепленные волокна на F) у мышей Sh3tc2-/- через 4 недели после интратекальной инъекции вектора AAV9 - miniMpz - SH3TC2myc. Ткани мышей, которым не вводили указанный вектор, показаны на А, С, Е как отрицательный контроль. Ядра клеток окрашены в синий цвет. Количественная оценка уровней экспрессии (% SH3TC2-положительных клеток) в поясничных корешках и седалищных нервах у n = 5 мышей показана на фиг. 17G.

Последовательности

SEQ ID NO. 1. Конструкция AAV - Mpz.Egfp

```
tagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaaagcccgggctcgggacaccttggctgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttctctgtagttaatgattaaccggccatgctacttatctacgt
agccatgctctaggtaccgggccccccctcgaggtcgacgggtatcgataagcttctgttcagactcgttctgtgtacccttcaatggc
ccccatcaaatcaaacacagatggcacatatctactctaaatatatgcagagcttcacaaacgtcatacagtaactgtgtcacacac
gcacacacacaccctccacctctgcccctaccttctgtgtcccatctagacattatccccccatccccctatttccccctatcaaaatggctg
ctcctcaaggttccaaataaacactgcttctggacctgactccttctctgaacttctgtgtaagtgtattctagtgcactgtgaccttg
glagtgtgagattgccctctgcttctccctctgctcctcctcctagtgatcttgagctttagaaagaactgaattaccattctaatacgag
cattctcgaactctccaaatagccaccaagcaggacaataggcagctttagatcattaaactgctgcatggcaaaagggaatcgaagga
tttctaacagaagtgggggggggggagatctgggcttctcctggaagttctctgatagagaaaatcttctgctgggtagaatctccca
ggatgcaggagatggaaaaagtgttcccaaggactttagtctacaggttggagccatcggaacaacgagacaccctaatltg
ggagtgtctgaaagaaactgctctagggcctagggctctcaggcaaggaggctaagaaggaatccttctgctgtagcctttggattt
aggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgctatgtccctttctgctcctctgctcaccaccaccccaacatccaacctagggtg
gggggaggtcagiatacacaaagccctctgtgtaaggggtggatgtgtccccccccccccctaccagagtatacaatgcccttctg
ctccatgccctgccacctcccaccacctctcaattgacatgccaggtgcaattggctcactggctcaggacagccccctcatgtgg
ggatccaggggatttaagcaggttccagaaaacaccactcagttccttctgcccccgctctctccaccacacagacgctctgccaagctt
gatatcgaattgatccaccggctgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtggtgcccctcctggtcgagctggacg
```

gcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcacc
accggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcaagtgttcagccgctaccccgaccacatgaa
gcagcacgacttctcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccg
cgccgaggtgaagttcagggcgacacccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctgggg
cacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaagggtgaactcaagatccgc
cacaacatcgaggacggcagcgtgcagtcggccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgc
aaccactacgtgagcaccagtcgccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagtctgtgaccgccc
cgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcggccctagatcaagcttatcgataatcaaccttgattacaaaatttgg
aaagattgactggattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgtatggc
ttcattttctcctctgtataaatcctggtgtgtctctttatgaggagtgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgtt
gtgacgcaacccccactggtggggcattgccaccactgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccaeaggcgg
aactcctgcccctgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgt
cctttcctggctgctcctgtgttggccactggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggacttcc
ttcccggcctgctgcccgtctgcccctctccgcttctgcccctcagacgagtcggatctccccttgggcccctccccgc
atcgataccgtcactcgtgatcagcctcgtgcttctgattgccagccatctgttgttgcctccccctgcttcttaccctgg
aaggtgccactcccactgtccttcttaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtgg
gcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggatgctgggtgggtctatggcttctgaggcggaaagaac
cagctggggctcactagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggtaatacattaactacaaggaacccctagtgatggag
ttggccactcctctctgcgcgtcgtcactgaggccggggcaccaaaggtcgcccagcccgggctttgccggggcggc
ctcagtgagcgcgagcgcgcagagctttttgcaaaagcctaggcctcaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggcc
gaggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttaggggcggga
tgggcggagttagggggcgggactatggttctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccac
acctggttctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacccctaactgacacacattcca
cagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcgggttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctc
ggtcgttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacat
gtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgctgtggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatc
acaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctcctcgtcgcgt
ctcctgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctc
agttcgggttaggtcgttcccaagctgggctgtgtgcagcaacccccgttcagcccagccgtcgccttatccgtaactatcgtctt
gagccaacccgtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtgctaca
gagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatfctgtatctgcgctctgctgaagccagttaccttggaaaaaga
gttggtagctcttgatccggcaaaacaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatct
caagaagatcctttgatctttctacgggctgacgctcagtggaacgaaactcagtttaagggtttgtcatgagattatcaaaaaggat
cttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtg
aggcacctatctcagcgtctgtctatttctcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggggcttaccatct

ggccccagtgctgcaatgataccgagagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagc
gcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgtgcccgggaagctagagtaagtagttcggcagtaatagtttgccc
aacgttgtgcccattgctacaggcatcgtgggtgacgctcgtcgtttggatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttac
atgatccccatgtgtgcaaaaaagcgggttagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagtggccgagtggtatcactcatggta
tggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtat
ggggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgtt
cttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgtgagatccagttcagatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactt
tcaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacagggaaggcaaaatcccgaaaaaaggggaataagggcgacagcggaaatgtgaatactcatac
tcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttc
cgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcacgaggccctt
tcgtctcgcgcttccgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgacgtcccggagacgggtcacagcttctgtgtaagcggatgccggg
agcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgtggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgag
agtgcaccattcagcgtctcccttatgacactcctgattaggaagcagcccagtagtaggttagggcgttagcaccgcccgcgcaag
gaatgggtgatgcaaggagatggcgccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaacaagcgtcatgagc
ccgaagtggcgagcccgatcttccccatcgggtgatgtcggcgatagggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccac
gatcgtccggcgtagaggatctggctagcgtatgaccctgctgattgggtcgtgaccatttccgggtgcgggacggcgttaccagaaact
cagaaggttcgtccaaccaaacgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccagatgctacacaattag
gcttgatcatattgtcgttagaacgcccgtacaattaatacataacccttatgtatcacacatacagatttaggtgacactatagaatacacggaa
ttaattc

Жирный шрифт = последовательность инвертированного концевой повтора (ИКП, англ. «ITR»)

Курсив = промотор Mpz

Подчеркивание = EGFP

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 2: конструкция AAV - Mpz.GJB1

tagctgcgcgctcgtcgtcactgagggcggccgggcaaaagccggggcgtcggggcactttggctgcccggcctcagtgagcg
agcagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctttagttaatgattaaccgcatgctacttatctactg
agccatgctctaggtaccctcgaagcttctgttcagactcgttctgtgtacccttcaatggccccacatcaaatcaaacacagatg
gcacatatactctaaatataatgagagcttcacaaaegtcatacacgtacgtgtgtcacacacgcacacacacaccttccacctg
cccttacccttctgctcccatctagacattatccctccctcccttatttcccttatacaaatggctgctccttcaaggttcaataaactg
cttctggacctgactccttctctgaacttctgtgtaagtgatttctagtgactgtgccttggtagttgtgagattgccctctgcttct
cccttctgctcctcatctagtgatcttgagcttgtagaaagaactgaattaccattetaatacagaccattctgaacttccaaatagcca

ccaagcaggacaataggcagcttgcacatttaaacctgctgcatggcaaaaggaatcgaaggatttctaacagaagtggggggggg
ggagatcgggcttctctggaagttctgatagagaaaatcttctgctgggtagaatctcccaggatgcaggagatggaaaaag
tgtcccaaggactttagtctacaggttgggagccatcggaacaacgagacacctaatttgggagtgctctgaaagaaacttgc
tctagccctagggctcaggcaaggaggctaagaaggaatcttctgtagcctttggatttaggttctcagcttatctatecctcag
agaagtgtctatgtccctttctgctcctgcctcaccaccaacattccaacctagggtagggggaggctcagatacacaag
ccctctgtgaaggggtggtatgttccccccccctaccagagtatacaatgccccctctgctccatgccccgccacctccac
cacctcctcaattgacatgccaggctcaattggctcactggctcaggacagccccctcatgctggggatccaggggattttaaagcaggt
ccagaaaacaccactcagttcctgtccccgctctccccccacagacgctctgccaagctcgagaatgaggcaggatgaactgga
caggtttgtacacctgtcagtgccgctgaaccggcattctactgccattggccgagtatggctctcggctcattctcagaatcatggtg
ctgggtgctgcagagagtgttggggtgatgagaaatcttctctatctgcaacacactccagcctggctgcaacagcgttctgatgac
caattctcccatctcccatgtgcccgtgtgctcctgcagctcattcttagttccaccagctctcctctgcccctgcaactggtcacc
agcaacacatagagaagaaaatgctacggcttggggccatggggaccctacacctggaggaggtaagaggcacaaggtccacat
ctcaggacactgtggtgacatctcctcagcctggtgttccggctgttcttggggcctctcattgatgtctttatctgctctaccctggc
tatgcatggtgctgctgctcaagtgcgacgtctacccctgccccaacacagtggactgcttctgctcccgccaccgagaaaacctctt
caccgtctctatgctagctgctcctctggcatctgcatcctcaatgtggccgaggtggtgtacctcattctccggcctgtgcccggcagc
ccagcggctccaatccacctcccgaaggctcgggctcggccaccgctctcacctgaatacaagcagaatgagatcaacaagct
gctgagtgagcaggatggctcctgaaaacatactgcgcccagccctggcaccggggctgggctggctgaaaagagcagccgctgc
tcggcctgctgaggatccctcgaggctgacgggtatcgataagcttatcagataatcaacctctggattacaaaatttgaagattgactgg
tattctaacctatgttctctcttctacgctatgtggatagcgtcttlaatgctttagtcatgctattgcttcccgtatgcttctcctct
tgtataaatectggttctctctctttagaggagtgtggcccgttctcaggcaacgtggctggtgtgcaactgtgttctgacgcaacc
ccactggttggggcattgcccaccctgtcagctcttccgggacttctgcttccccctcctattgccaaggcggaactcctcggcc
tgccttggccgctgctggacaggggctcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgttctgggggaaatcagctcttcttggctgct
cgctgtgttcccactggattctgcgaggacgtcttctgelaegcttctggccctcaatccagcggacttcttcccggcggctgc
tgcggctctgcccctcttccgcttctgcttgcctcagacgagtcggatctcccttggggcctccccgcatcgataaccgtcga
ctgctgacagcctgactgtgcttctagttgccagcattgttgttccccctccccctgcttcttgacctggaaggtgacctccc
actgtccttctcctaataaaatgaggaaattgcatcgctgtgtagtaggtgtcattctattctggggggggggggcaggacagcaag
ggggaggattgggaagacaatagcagcagctgctgggatgcggtggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcga
ctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggtaatacctaactacaaggaaccctagtgtgaggattggccactcctct
ctgcgcgctcgtcgtcactgaggcggggcagcaaaaggtgcgccgacgccggcttggccggggcctcagtgagcagc
gagcgcgagagcttttgcaaaagcctaggcctcaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgaggcggcctcggc
ctctgcataaataaaaaaattagtcagccatggggcggaagatgggcggaactggcggaagttagggcgggatggcgaggatgag
ggcgggactatggtgctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctggggacttccacacctggttctgact
aattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctggggacttccacacctcaactgacacacattccacagctgattaatga
atcgccaacgcgcccgggagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttccgctgc
ggcgagcggatcagctcactcaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggc

cagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaanaatcgacgc
tcaagtcaaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgtccgacct
gccgcttaccggatactgtccgcttttcccttcgggaagcgtggcgttttccatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggttaggtc
gttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtccaaccggg
aagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagt
gtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagctctga
tccggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttg
atctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggattttggtcatgagattcaaaaaggatcttcacctagatcct
ttaaataaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcag
cgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgca
atgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctctgc
aactttatccgctccatcagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgcagttaatagtttgcgaacgttgttgcattgct
acaggcatcgtgggtgcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgt
gcaaaaaagcgggttagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataa
ttctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttg
ctcttccccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtctcatcattgaaaacgttcttcggggcgaaaact
ctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgg
gtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatatt
attgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccc
gaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcttcc
ggatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctccccggagacgggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagccccg
tcaggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgactgagagtgaccattcgcac
gctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggccgttgagcaccgccgccgaaggaatggtgcatgcaa
ggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagc
ccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatafagggccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatcgtccggcgta
gaggatctggctagcagatgacctgctgattggttcgctgaccatttccgggtcggggacggcgttaccagaaactcagaagttcgtcca
accaaacggactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcg
ttagaacggcgtacaattaatacataaccttatgtatcacacatacagtttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор M_pz

Подчеркивание = C_x32

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 3: конструкция AAV - miniMpz.Egfp

tagetgcgcgctcgctcgctcactgagggcgcccgggcaaaagcccgggctcggggcgacctttggctgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggtcctttagttaatgattaaccgcctgctacttatctacgt
agccatgctctaggtaccgctcaggaaggaggttaagaaggaatcctttagctgtagcctttggatttaggtttcagcttatctatcc
ctcagagaagtgtctatgtccctttctgctcctctgectcaccaccccaacattccaacctagggtagggggagggtcagtatatac
aaagccctctgtgtaaggggtggatgtgtccccacccccctaccagagtatacaatgccccttctgctccatgcccctgccaccctc
ccaccaccttcaattgcaatgccaggtgcaattggctcactggctcaggacagccccctcatgctggggatccaggggattttaagc
aggttcagaaaacaccactcagttccttgcctccctctcaccacacagacgctctgccaaccggctgccaccatgggtgagcaag
ggcgaggagctgttaccggggtggtgcccatcctgctcagctggaacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagg
gcgaggggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgacc
acctgacctacggcgtgcaagcttccagcctaccggaccacatgaagcagcacgacttctcaagtccgccatgcccgaaggctac
gtccaggagcgccacctcttctcaaggacgacggcaactacaagaccggcgccgaggtgaagttcagggcgacaccctggtgaacc
gcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctat
atcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcgacc
actaccagcagaacccccatcgccgacggccccctgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagctccgccctgagcaaaaga
ccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccggccgggatacctctcggcatggacgagctgtacaagtaaag
cggccctagatcaagcttctgataatcaacctctggattacaaaatttggaaagattgactggatttctaactatgttgccttttacgct
atgtggatacgtgtttaaagcctttagtatactgctattgttcccgatggtttcaatttctccttctgtataaatctgggtgtgtctttaa
gaggagttgtggccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttagctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacc
tgtagctccttccgggacttctgcttccccctccctattgccacggcggaactcctcgcctgcccgtgtgtggacaggggccc
tcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgttgcggggaatcctcgtccttccctggctgctcgcctgtgttgcacctggattctgcgc
gggacgtccttctgctacgtcccttggccctcaatccagcggaccttccctcccgccctgctgcccggctctgccccttcccgctt
cgcttgcctcagacgagtcggatcctccttggggcgccctcccgcatcgataccgtcgactcgtgatcagcctcgactgtgccttct
agttgccagccatctgttgttgcctcctccctgccttctgacctggaaggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaatt
gcatcgcttctgtagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag
gcatgctggggatcggtgggtctatgcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcgactagagcatggctacgtagataagta
gcatggcgggttaatcattaactacaaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgctcgctcactgagge
cgggcgaccaaaaggtcggcgacggccgggctttgcccgggcccctcagtgagcgagcgagcgcgagagcttttgcaaaagc
ctaggcctcaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgagggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcag
ccatggggcgagagaatgggcggaactgggcggagttagggcgggatggcgaggatagggcgggactatggttctgactaattga
gatgcatgctttgcatactctgctgctggggagcctggggactttccacacctggttctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgc
ctgctggggagcctggggactttccacaccctaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcg
tttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgctcggtcgttcggctcgggcgagcggatcagctcactcaaagcc
ggttaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaag
gccgctgtgctggcgcttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagtcaaggtggcgaaccggaca

ggactataaaagataaccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcttcc
tcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacga
acccccggtcagcccaccgctgcgccttaccggtaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcag
ccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcggtgtacagagttctgaagtggggcctaactacggctacactagaagaac
agtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctggtagcgg
tggttttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggctgacgctcagtggga
acgaaaaactcacgtaagggttttggcatgagattatcaaaaaaggatcttcactagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatcaatcta
aagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcc
tgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgg
ctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttaccgcctccatccagtctattaatt
gttccgggaagctagagtaagtagttgccagtaatagtttgcgaacgttggcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttt
ggtagggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctcctcggctctc
cgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgct
ttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataatac
cgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatattggaaaaagcttctcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccag
ttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgcc
gcaaaaaaggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcattatcagggttattgtctcatga
gaggatacatattgaaatgatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaacca
ttattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacaggcccttctcgtctcgcgcgttccgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatg
cagctcccgagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttggcgggt
gtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaag
cagcccagtagtaggttggagccgttgagcaccgcccgcgaaggaatgggtgatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggcca
cggggcctgccaccatacccacgccgaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgata
tagggccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgctcggcgtagaggatctggctagcagatgacctgctgat
tggctcgtgaccatttccgggtgcgggacggcgttaccagaaactcagaaggttctccaacaaaccgactctgacggcagtttacgag
agagatgatagggtctgctcagtaagccagatgctacacaattaggcttgcacatattgtcgttagaacgcggctacaattaatacataacctt
atgtatcatacacatacagatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор mini-Mpz

Подчеркивание = EGFP

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 4: промотор Mpz

cctgttcagactcgttctctgtgtacccttcaatggccccacatcaaatcaaacacagatggcacatatctactctaaatatgcagagctc
acaaacgtcatacacgtacgtgtgtcacacacgcacacacacccttccacctctgcccttacctttgctgtcccatctagacattatccctcc
catcccctatttcccttatcaaatggctgtccttcaaggttcaaataacactgcttctggacctgactcctttctctgaacttctgtgtt
aagtgtattcctagtgcactgtgccttgtagttgtgagattgccctctgcttctccctctgctcctcatctagtatcttgagctttagaaaag
aactgaattaccattctaatacagacattctcgaactctcaaatagccaccaagcaggacaataggcagcttctgatcatttaactgctgcat
ggcaaaaaggaatcgaaggatttctaacagaagtgggggggggggagatctgggcttctctggaagtttctgatagagaaaatcttctg
cctgggtagaatctcccaggatgcaggagatggaaaaagtgtcccaaggactttgtagtctacaggttggagccatcggacaacg
agacaccctaattgggagtgctctgaaagaaactgcctctagggcctagggctctcaggcaaggaggctaagaaggaatccttctgctga
gccttttgatttaggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtccctttctgctcctctgcctcaccaccaccaattccaa
cctagggtagggggaggtcagtatacacaagccctctgtgtaaggggtggtatgtgtccccccccctaccagagtatacaatgcc
ccttctgctccatgccctgccaccctcccaccctctcaattgcacatgccaggctgcaattggctactggctcaggacagccccctcatg
ctggggatccaggggattttaagcaggttccagaaaacaccactcagttccttctccccgctctctccaccaccacagacgctctgcc

SEQ ID NO. 5: промотор miniMpz

gctctcaggcaaggaggctaagaaggaatccttctgctgtagccttttgatttaggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgt
cccttttctgctcctctgcctcaccaccaccaattccaaccttagggtagggggaggtcagtatacacaagccctctgtgtaaggggtg
gtatgtgtccccccccctaccagagtatacaatgcccttctgctccatgccctgccaccctcccaccctctcaattgcacatgc
caggtgcaattggctactggctcaggacagccccctcatgctggggatccaggggattttaagcaggttccagaaaacaccactcagttc
cttgtccccgctctctccaccaccacagacgctctgcc

SEQ ID NO. 6: ген коннексина-32 (Cx32): GenBank: AY408135.1

atgaactggacaggttgtacacctgctcagtggcgtgaaccggcatttactgccattggccgagatggctctcggtcatcttcatctcag
aatcatggctgctgggtggctgcagagagtgtgtgggtgatgagaatcttcttcatctgcaacacactccagcctggctgcaacagcg
tttctatgaccaattcttccccatctccatgtcggctgtggtccctgcagctcatctagtttccaccagctctcctctggtccatgcacg
tggtcaccagcaacacatagagaagaaaatgctacggcttgaggccatggggaccctcacctggaggaggtgaagaggcaca
gggtccacatctcaggacactgtggtggacatgtcatcagcgtggtgtccggctgtgtttgaggccgttctcatgtatgtctttatctgctc
taccctggctatgcatggtgcggctggtcaagtgcgacgttaccctgccccaacacagtggaactgcttctgttccgccccaccgaga
aaaccgtcttaccgtcttcatgtagctgctctggcatctgcatcctcaatgtggccgaggtggtgtacctcatcatccgggcctgtgc
ccgcccagcccagcggcctccaatccaccttcccgaagggtcgggcttggccaccgctctcacctgaataacaagcagaatgagat
caacaagctgctgagtgagcaggatggctccctgaaagacatactgcgccgagccctggcaccggggctgggctggctgaaaagagc
gaccgctgctcggcctgctga

SEQ ID NO. 7: ген белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2): GenBank: BC114486.1

atgggtggctgcttctgcatccccaggagcggagtctgacccggggcccaggtaaagaaactccttccaaggatccaact
gtatcgagtgagtgtatagcctcatctgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacctgacactctccttctgtgtaa
gagccgctccaggaggtgtgaaatggacccctacaggaagctgctcggaggcggctctgggactggagaatgaggaccaggaggtg
cgcatgctgttaaggacctctcagcaaggttggtcagatccagtctcagagggcccagtttctcatcacctcaagaccatggaggaaatct
ggaagttctccacctacctaatttagaacatctcctcttgaccacaagtactggctcaactgcatattggtggaggatacagagatccaagt
tctgtagatgataaacacctggaaacaatatacctgggactcctgatacaggaaggccacttctctgcagagccctgtgctccgtgactcca
ccagccgagaaggaagggaatgcttgacctttgcaagaatgagtaatctcagtgaagatggcagaagctggctccgagttggaaggc
gtgtctttggtgacaggtcagcggggcctggactgggtgacgcttgagcctctgcctctcccttccaccagtggctcctaaagaattatc
caggaagctgtggccttccaggaagaggattggacaggctcctatcagattggcagaggacgctgtaaggccttgacgggttatgagc
caggagaaaaggatgaactgaatttctaccaggagaaagcattgagatcatcggcttctcatacctgggctcagtggtcattggaagt
cgacaagttcaggacaagtgggcttctcccaccaggaacatagatcctgattctattcccaatgagcaggaactctgccttctcagtga
tgaggagagatgctccctgttggcctgggaagtataagcagactgagtgtccagcttctccacctctgtctgactgacatcacatc
tgtctaccggctcagtggttgaatccatccagaatcctcaaatgatctgagtgcacccagcctgaaggctcaaggaggtcaggcctg
gcagagcctgggaggagcatcaggccgtgggtccagacagtccagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctcctctcggc
cacctcagacagctatgcctgccggagcctgatgacctgatgaccggaactgctcatggacctaagcactggcagggaggaggc
tgagaacttcgccccatattggcttcttgatcatgagggttatgctgaccacttaagagtctctatgacttctccttctcttccacttctcc
tttatagcttctgaggaggatgagttgtggcctacctggaggcatcaagaaagtgggccaagaagagccacatgacctgggcccacg
ccggctctgcttctcctggccggctgagcatcaggaaggtcaactctctcaggccagggtgactctgaggaggccatccacattctca
atggagcattgaggacctatccttgggtggcactctgtacatcaatttggctgccatctacctgaaacagaggctgagacataaaggctccg
cctgttggaaaaggcaggtgcctgctggcctgctgacctgagctagtccaagcagcactgacgtgggtggcctacgtgct
gcccaggggattgtggtggcagcagcccgtggaggccaggcctgcttctggccatccgcttctcctgagcctaggccggcacg
aggaggtcctgcccttggcagcgcctgcagctcctctctggacacctcctgctctgaggctgtggccaggtttttagtttctgtatga
caagaaatatctccacacctgacgtggcctctgtccagcaacatggtatccagagtcccaaggatgtcttctcctatttggcaggtccac
ctgtcctccagaacacaaccaagctccttggcttcttcccaggctggggtgaagttctgccttggcctgccaatgctcagacaggcc
ctggctgctgtgaggaactagcagaccggagcaccagaggccctgtgtctcatcttccaaagtgtacctcagacaggtctcctg
acggtgccatccactacctgagccaggccttgggtgtagggcagctgctgggtgagcaggaatcctttagtcttctctgctgctggcatgg
gcctatctcttagccagccaggccaagaaggcttggatgtgcttgagccactgctatgctccctgaaggagacagagagtctcactcaaag
gggagtcatctataacctcctgggacttgactccaaggtgaaggccgggtgaacagggcagccaagagctatctcgggcttgaacag
agcccaggaggtgggagatgtgcataaccaggcagtggtatggccaatcttggccacctgagccttaagtctgggctcagcatccagc
cagaaactatctcctgcaggctgtacactctatttgaactcaggccagtaaggagacagacatggaattagtaggtgttctctggtg
gccaagtctggtgtctggacaccagctgaccttcttgttatgaaatggcattgctgttggcttaaggcatcgacatctaaagag
tcagctcaggccaccaatccctctgccattctacagctctgtgccccaaacctgaggcatgcatcacctaccatgagcactggctggc
cctggctcagcaactcaggaccgggagatggaaggaggctgctggagtccctggggcagcttctcggaaacctaaataccgccaggt
ccctcaggaggtcactcacatgcatcaaggagagcctgctatctcattgacctgggggagacagacaaggctgctgaggcctggctt
gggcccgggactccactacctcatgcaggaagacgagctggtggagctgtgctgcaggcagccatccagacagccctgaagtcaga

ggagcctttgctggctctcaactttatgaagaagcaggtgatgtgttctcaatgggacccgccacaggcatcatgagtgaggactaccg
agctggagctgttcttttagcaaggaggtgaaggcggtgagaactgagctccggattttcaataagctgacagagctgcagattagcctcg
aaggctatgagaaggctttggaattgccaccctggccgccaggctcagcacagtcacaggagatcagaggcaagagctggtggccttc
accgctggctacagtgtactactccctgcacatgtatgagatggctgaggactgtacctgaagaccctgtccctctgtccaccctggctgc
agagtccaaggaggccctgtactatgccaagggtattatcgctgggcagactcaccttctgccagctgaaggatgccatgatgccact
gagtacttcttctggcctggcagcagcggtcctgtgggtgatgaggagctcaggacaccattaggagcaggctggacaacatctgcc
agagcccctgtggcacagcaggccctccgggtgctcctcagagagggcgcggtggctgagtgggtggcctggcctctga

SEQ ID NO. 8: ген периферического миелинового белка 22 (PMP22): референсная последовательность NCBI: NM_000304.4

agttacagggagcaccaccagggacaatctcggggagcctggttgaagctgcaggcttagtctgtcggctcgggtctctgactgccct
gtggggagggtcttgccttaacatcccttgcatttggctgcaagaaatctgcttgaagaaggggttacgctgtttggccgggcgaaact
ccgctgagcagaacttgcgccagaatgctcctctgttctgagatcatcgtcctccacgtcgggtgctgggtgctgttctctccac
gatcgtcagccaatggatcgtgggcaatggacacgcaactgatctctggcagaactgtagcaccttctcaggaatgtccaccactgttt
ctcatcatcaccaaaagcaatggctgagctgtcaggccaccatgatcctgtgatcatcttcagcattctgtctctgttctcttctgcaa
ctcttcaccctcaccaggggggcaggtttacatcactggaatcttcaaaattctgctggctgtgctgagtgctgcccactctacac
ggtagggcaccggagtgcatctcaactcggattactctacggtttcgctacatcctggcctgggtggcctccccctggccttctcag
cgggtgatctatgtgatcttgcggaacgcgaatgaggcgcccagcggctgtctgaggctctgagcgtacataggggaaggaggaag
ggaaaacagaaagcagacaaaagaaaaagagctagccaaaatccaaaactcaaaccaaacagaaagcagtgagggtggggg
ttgctgttgattgaagatgtatataatctccggtttataaacctatttataaacctttttacatataatgtacatagattgtttgcttttatgttgacc
atcagcctcgtgttagccttaagaagtagtaaggaactttacatcctaacagtataatccagctcagatttttgtttgtttttgtttgttt
tgttttaccagaaataagataactccatctcgcccttcccttcatctgaaagaagatacctccctcccagtcacctcatttagaaaacaaa
gtgtgggtagaaaccccaatgtccaaaagccctttctggtgggtgaccagtgatccaacagaaacagccgctgcccgaacctctgtgt
gaagctttacgcgcacacggacaaaatgccaaactggagcccttgcaaaaacacggctgtggcattggcatacttgccttacaggtgg
agtatcttctcacacatctaaatgagaaatcagtgacaacaagctttgaaatgggtgctatggatttaccattccttattatcactaatcatctaaa
caactcactggaaatccaattaacaattttacaacataagatagaatggagacctgaataattctgtgtaataaatggtttataactgcttttga
cctagctaggctgctattactataatgagtaaatcataaagccttcatcactcccacattttcttacggctggagcatcagaacaagcgtct
agactcctgggaccgtgagttctagagcttggctgggtctaggctgttctgtgcctccaaggactgtctggcaatgactgtattggccacc
aactgtagatgtatataatggtgcccttctgatgtaagactccagacctttgtttgtttgctttctgattttataccaactgtgtggactaaga
tgcattaaaataaacatcagagtaactca

SEQ ID NO. 9: ген миелинового белка ноль (MPZ): GenBank: AK313555.1

agttcctgggtccccactttctcaaccccacagatgtcggggccctgccccctgccccagctatggctcctggggctccctcatccagccc
cagccctatcctggctgtgctgctcttctcttcttggctgtgtccccggcccaggccatcgtggtttacaccgacaggaggtccatggtgct
gtgggctcccgggtgaccctgactgctccttctggtccagtgagtgggtctcagatgacatctccttcacctggcgctaccagcccgaagg

gggcagagatgccatttcgatcttccactatgccaagggacaacacctacattgacgaggtggggacctcaaaagcgcacccaagtgggta
ggggacctcgcctggaaggatggctccattgtcatacacaacctagactacagtgacaatggcacgttcactgtgacgtcaaaaacctcc
agacatagtgggcaagacctcaggtcacgctgtatgtctttgaaaaagtccaactaggtacgggctggtctgggagctgtatcgggg
gtgtcctcgggggtgctggtgctgctgctctttctacgtggttcggtactgctggctacgcaggcaggcggccctgcagaggaggctc
agtgtatggagaaggggaaattgcacaagccaggaaaggacgcgtcgaagcgcggcgccagacgccagtgctgtatgcaatgctg
gaccacagcagaagcaccaaagctgtcagtgagaagaaggccaaggggctgggggagtctcgcaaggataagaatag

SEQ ID NO. 10: ген белка 2 раннего ростового ответа (EGR2): референсная последовательность NCBI: NM_000399.5

aactgagcagggagcaattgattaatagctcggcgaggggactcactgactgttataataaactacaccagcaactcctggctcccagca
gccggaacacagacaggagagagtcaaggcaatagacatctttcttataaaaaacagcaactgtttgctactttttctgttgatttt
ttttcttggtgtgtggtggtgttttaagtgtggagggcaaaaggagataccatcccaggctcagccaacctctccaaaacggctttc
tgacactccaggtagcagggagttgggtctccaggtgtgagaggcaaatgatgaccgcaaggccgtagacaaaatcccagtaact
ctcagtggttttgtgaccagctgtctgacaacatctaccgggtggaggacctcgccgccacgtcggtgacctctttccaatgccgaactg
ggaggcccctttgaccagatgaacggagtgcccgagatggcatgatcaacattgacatgactggagagaagaggtcgttgatctcca
tatcccagcagctttgctcccgtctctgacctagaaacagaccttacttacatgggcaagttctccattgacctcagtaacctggtgcca
gctgctaccagaaggcataatcaatattgtgagtgcaggcatcttgaaggggtcacttcccagcttcaaccacagcctcatccagcgtc
acctctgcctcccccacacctggccacaggacctgggtgtgtgacatgtcccagaccagcctgacctggaccacctgtactctc
cgccaccgctcctcctctattctggctgtgacaggaccttaccaggaccttctgcttctgtcagcagccaccacctccacctctc
ctctctggcctaccaccacctcttctctatccatcccccagccagccacggaccaggtctcttccaatgatcccagactatctggattc
ttccatctcagtgccagagagacctacatggtacagctggcccagaccgtaagccctttccctgcccactggacacctgcgggtgcccc
ctccactactccactcttacaatccgtaactttacctggggggccccagtgctggggtgaccggaccagggggccagtggaggcagcg
agggaccccggctgcctggtagcagctcagcagcagcagcagccgccgcccgcctataaccacaccacctgccactgcggc
ccattctgaggcctcgaagtacccaacagaccagcaagacgccggtgacgagagccctaccctgcccagcagaaggctgcga
ccggcggttctccgctctgacgagctgacacggcacatccgaatccacactgggcataagcccttccagtgtcgatctgatcgcgaac
ttcagccgagtgaccacctaccaccatccgcacccacaccggtgagaagcccttgcctgtgactactgtggccgaaagttgccc
ggagtgatgagaggaagcggcacaccaagatccacctgagacagaaagagcggaaaagcagtgccccctctgcatcgggtgccagccc
cctctacagcctcctgctctgggggctgacgctgggggtaccctgtgacgagtaacagcagcagcttggcgaggggccgctcgcc
ccttgctcctctcggaccggacacctgagatgagactcaggtgatacaccagctcccaaaggtcccgaggccctttgtccactggag
ctgcacaacaacactaccacctttctgtccctctctccctttgttgggcaaaaggctttgggtggagctagcactgccccctttcacctaga
agcaggttctcctaaaacttagccattctagctctcttaggtgagttgactatcaaccaaggcaaggggaggctcagaaggaggtggt
gtggggaccccctggccaagagggtgaggtctgacctgctttaaagggtgtttgactaggtttgtaccccacttcccctattttgaccca
tcacaggtttttgacctggatgacaggtgatcaagcgttttctacaataggttgggagatgctgatccctcaagtggggacagcaaaa
agacaagcaaaaactgatgtgacctttatggcttgggactgatttggggacattgtacagtgagtgaagtatagcctttatgccacactctgtg
gccctaaaatggtgaatcagagcatatctagttgtctcaaccttgaagcaatattgtattataaactcagagaacagaagtgcattgtatggg

aggaacatagcaatatctgctcctttcagtggtttgagaaatgtaggctatTTTTcagtgatatccactcagatTTTgtatTTTgatgtacact
gttctctaaattctgaatctttgggaaaaatgtaaagcattatgatctcagaggtaacttattaagggggatgtacatatattctctgaaacta
ggatgcatgcaattgtgtggaagtgccttggccttgtgtgatgtagacaatgtacaaggctgcatgaaatgggtgccttattatggag
aaaaaaatcactccctgagtttagtatggctgtatTTTccttataatTTTggaatTTTTtagaaagtatTTTgtatgctTTTgttTgtgactt
aaaagtgtaccTTTtagtcaaatTCagataagaatgtacataatgtfaccggagctgattgTTTggtcattagctcttaatagttgtgaaaaa
taaatctattctaacgcaaaaccactaactgaagttcagataatggatggtTgtgactatagtgtaataaatactTTTcaacaata

SEQ ID NO. 11: ген белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1): референсная последовательность NCBI: NM_018972.3

atggctgagaggcaggaagagcagagagggagcccgccttgagggcggaaggcaagccgacgagggttaagctcattctgtac
cattggacgcattcctcagctctcaaaaggTgcgcttggaattgctgaaaaggcattgaagtgcgaggaaatgatgtaagtctgccctt
agtgagcacaatgagccttggtttatgcgttgaactcaactggagaagtgcctgtccttatccacggggaaaacataattgtgaggccactc
agatcattgattatcttgaacagacttctggatgaaagaacaccaggttaatgcctgataaagaaagcatgtattaccacgggtacaaca
ttaccgagagctgctgactccttgccaatggatgcctatacacatggctgcattttacatcctgagttaactgtgactccatgatcccggctta
tgcaactacaaggattcgtagccaaattggaacacagagtctgagctgaagaaactTgctgaagaaaaccagatttacaagaagcatac
attgcaaaacagaaacgacttaaatcaagctgctgatcatgacaatgtcaagtattgaagaaaattcttgatgagttggagaaagtcttgg
tcaggtgaaactgaattgcaagaagaatgaagaaacccagaagagggccagcaacctggctctgcggtgaatccttcacctggc
agacgtctcactcgctgtcacattgcatcactgaagttcctggggttTgcaaggagaaactggggaacggaaagcgaccaactTgga
acctattacgagcgtgtctgaagagaaaaacatttaacaaggttttaggacatgtcaacaatatattaatctctgcagtgtccaacagcatt
ccgggtggccaagaaaaggccccaaaagtcttggcacgacctgtggtggttTgctgacggagtgatTTTgctttatgctttca
gaaagaggcttggcagcatgatattagcatttagaccagaccaattattctag

SEQ ID NO. 12: ген белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1): референсная последовательность NCBI: NM_001135242.1

atgtctcgggagatgcaggatgtagacctcgctgaggtgaagccttTggtggagaaaggggagaccatcaccggcctcctcaagagttt
gatgtccaggagcaggacatcgagactttacatggctctgtTcacgtcacgctgtgtgggactcccaagggaaaccggcctgtcatcctcac
ctaccatgacatcgcatgaaccacaaaacctgctacaaccccccttTcaactacgaggacatgcaggagatcaccagcactttgccgtct
gccacgtggacgccctggccagcaggacggcgcagcctcctccccgagggtacatgtaccctccatggatcagctggctgaaatg
cttctggagctctTcaacagttTgggctgaaaagcattattggcatgggaacaggagcaggcgcctacatcctaactcgattTgctctaaca
acctgagatggTggaggccctTgtccttatcaactgaacctTgtgcggaaggctggatggactgggcccctccaagatctcaggatg
gaccaagctctgccggacatggTggtgtcccactTTTgggaaggaagaaatgcagagtaactggaagtggTccacacctaccgcca
gcacattTgfaatgacatgaacccggcaacctgcacctTtcatcaatgcctacaacagccggcgcgacctggagattgagcgaccaatg
ccgggaacccacacagtcacctgagTccctgctctgtTggtggtTggggacagctcgcctgagTggatgccgtggtggagTgcaac
tcaaaattgaccacaagaccactctctcaagatggcggactgtggcggcctcccgcagatctcccagccggccaagctcgctgag

gccttcaagtacttcgtgcagggcatgggatacatgccctcggctagcatgacccgcctgatgcgggccgcacagcctctggttccagcgt
cacttctctggatggcaccgcagccgctcccacaccagcagggcaccggaagccgctcccacaccagcagggcaccgcagccg
ctcgcacaccagcagggggccacctggacatcccccaactcgggtgctgctgggaacagcgcggggcccaagtccatggaggtc
tctgctag

SEQ ID NO. 17: конструкция AAV - Mrz человека - GJB1

**tagctgcgcctcgtcgtcactgagggcggccgggcaaaagccggggcgtcggggcactttggctgcccggcctcagtgagcg
agcagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggtcctttagttaatgattaaccgcatgctacttatctactg
agccatgctctaggtaccgctggcataaacttcatttataaagtattttgtcttaatctctcatataacttagtcttctgatattgcagct
gtgtgcccccttttctactcccagcattttgtcattactaaaggaagtgtcatggctattatacttgattgttgatgggtttgtcctctgate
tccccatccacctccccaaacaaatttcaactccttctggaaggacttaatttttctctctctattactgcattctcacttaca
tattgtggcacttaatacaatttgtagccttgaataaattgaaatggacttaaacagcagcatgaagcactgaaggacttcttgacaa
acggaaaggtcaggggcttctgctggaaatagtcagtgagaaaaacttctgctgggaagaatcgcacaggatgaagggaggt
gcggggaaaaaacccccataggacttggctatctcaagaagtctglaatgcagccacattagaggagataacaggggataccta
tttcagagttctctgggggaaacctcctctagttcctagggctgtgagggcagcctctctcaggcaaggaggtgaggagaaatcccttt
ttatggcctttaaattgaggttccatactatccccagagaagtgtgtctgtgcttcttcttctcccccccccccccaacatt
ccagcctggggcagggggaggccagtggacacaaagccctctgtgtatgggggtggtatgtgtccccccccctccaccagactat
acaatgccccctctgctccccgcactctgccccctccccaccctctcaactgcacatgccaggtgcaattggttactggctgaggac
agccccctcatgctggggccctaggggatttaagcaggttccaggaacccccggctcagttcctgggtccccactttctcaacccccaca
gatgctccgggccccctgccccgagcaccggctcgcggatcctgaggcaggatgaactggacaggtttgtacaccttctcagtgcc
gtgaaccggcattctactgccattggccgagtatggctctcggctccttcatcttcagaatcatggtgctggtggtgctgcagagagtgtg
ggggtgatgagaaatcttcttctatctgcaacacactccagcctggctgcaacagcgtttgctatgaccaattctccccatccccatgctg
gctgtggtccctgcagctcatcctagtftccaccagctctcctcgtggccatgcacgtggctcaccagcaacacatagagaagaaaatgc
tacggcttgagggccatgggaccccctacacctggaggaggtgaagaggcacaaggtccacatctcagggacactgtgtggacctat
gtcatcagcgtggtgttccggctgttttgaggcccttcatgtatgtctttatctgctctaccctggctatgccatggtgctggtgcaagt
gcgacgtctaccctgccccaacacagtggactgcttctgttccccccaccgagaaaaccgtcttaccgtcttcatgctagctgctct
ggcatctgcatcatcctcaatgtggccgaggtggtgtacctcatcatccgggctgtgcccggcagcccagcggcctccaatccacctc
ccgcaagggtcgggcttggccaccgctctcacctgaatacaagcagaatgagatcaacaagctgctgagtgagcaggatggctccct
gaaagacatactgcggcagccctggcaccgggctgggctgctgaaaagagcagccgctgctcggcctgctgactcgagatcgat
atccatcacactggcggccgaagcttctgataatcaacctctggattacaaaatttggaaagattgactggatttcttaactatgttget
cttttacgctatgtggatacgtctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctctccttctgataaactcgtgtg
ctgtctttatgaggagttgtggccgttgcaggcaacgtggcgtgggtgtgcaactgtgttctgacgcaacccccactggttggggcat
tgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgccacggcggaactcagccgctgcttcccgtgctg
gacaggggctcggctgttgggcaactgacaattccgtgggtgtgtcggggaaatcagcttcttcttggctgctcgcctgtgttgcacct**

ggattctgcgaggacgtccttctgctacgtcccttggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgtgccggctctgcggcc
cttccgcgttcttgccttgccttcagacgagtcggatctccctttggccgcctccccgcacgataaccgtcgactcgtgatcagcctcg
actgtgccttctagttgccagccatctgttgttcccctccccgtgccttcttaccctggaaggtgccactcccactgtccttcttaataa
aatgaggaaattgcatgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaa
gacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcgactag**agcatggctac**
gtagataagtagcatggcgggttaactattaactacaaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgtcgc
ctcactgaggccggggcaccaaaaggtcgcgccgacgccgggctttgccggggcgcctcagtgagcgcgagcgcgcgagcgcgagcgcg
tttgcaaaagccttaggcctccaaaaagcctcctcactactctggaatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgcataaataaaa
aaaattagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttagggcgggatgggcggagttagggcgggactatggtt
gctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctggttctgactaattgagatgcatgct
ttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctaaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcg
gggagaggcgggttgcgtattgggcgctcttccgcttctcctgctcactgactcgtcgcctcggctcgtcggctcggcgcgagcggatcagc
tactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagg
aacctgaaaaaggcgcggttgcgtgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggc
gaaaccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctcctcgtcgcctctcctgttccgacctcgcgcttaccggatac
ctgtccgcttctccttccgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctggg
ctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcctgctgccttatccggtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatcgc
cactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgcgaggtatgtaggggctcagagagttcttgaagtgggtggcctaactacggcta
cactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttccgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccac
cgctggtagcgggtggtttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctg
acgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagt
ttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgcgctgtctatttcgttca
tccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccc
acgctcaccggctccagatttatcagcaataaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatcgcctccatc
cagctattaattgttccgggaagctagagtaagtagttccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtc
acgctcgtcgttggtagtggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggttagc
tcttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgcataaattcttactgtcatgcat
ccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttcccggcgtcaat
acgggataataccgcgccacatagcagaactftaaaagtctcatcattggaaaacgttcttccggggcgaaaaactcgaagatcttaccgct
gttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaaacaggaa
ggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggt
tattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgt
ctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgagcccttctgtctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaaac
ctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgg
gtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactcc

tg cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgccaaca
gtccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggt
gatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatgctccggcgtagaggatctggctagcg
atgacctgctgattggttcgctgaccattccgggtgccccgacggcggtaccagaaactcagaaggttcgccaaccaaaccgactctgac
ggcagtttacgagagagatgatagggctgcttcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgctgtagaacggcgctaca
ttaatacataaccttatgtatcatacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор Mrz человека

Подчеркивание = Cx32

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 18: промотор hP0 человека

gcctggcataaacttcattattaaagttttttgtctttaatctctcatataacttagtcttctgatattgcagctgtgtgtgccctctttgtactc
ccagcattttgtcattactaaaggaagtgtcatggcttattatacttgattgttgatgggtttgtcctctgatcttcccatctccacctccccaacc
aaatttcaactcctgctggaaggacttaattttattcctctctctattacctgacttctacatttcatattgctggcacttaatacaatttttag
ccttgaataaattgaaatggacttaaacagcagcatgaagcactgaaggacttctgacaaacggaaaggtcaggggcttctgctgga
atagtcagtgagagaaaaacttctgtctgggaagaatcgcacaggatgaaggagggtgcggggaaaaaaactccataggacttggtcat
ctcaagaagtctgtaatgcagcccacattagaggagataacaggggatctcttttcagagttctctgggggaaacctccctctagttccta
gggctgtgaggcagcctctcaggcaaggaggctgaggagaaatcccttttatggcctttaaattgaggttccatctatccctcagaga
agtgtgtctgtgccctgtttttgtccctctccctcaccacccccacaacattccagcctggggcagggggaggccagtgacacaaagcc
ctctgtgtatgggtggtatgtgtccccaccctccaccagactatacaatgcccttctgctccctgactctgccccctccccaccac
ctctcaactgcacatgccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgctggggcctaggggatttaagcaggttccagg
aacccccgttcagttctgtgccccactttctcaacccacagatgctccggggccccctgccccctccccagc

SEQ ID NO. 19: контрольная конструкция AAV - Mrz человека - Egfp

**tagetgcgcgctcgctcgctcactgaggecgcccgggcaaaagcccgggcgctggggcgaactttggtegcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagaggagtgggcaactccatcactaggggtccttgtagttaatgattaacccgcatgctacttatctactg
agccatgctctagtagccctggcataaaacttcattattaaagttttttgtctttaatctctcatataacttagtcttctgatattgcagct
gtgtgtccccctttttgactcccagcattttgtcattactaaaggaagtgtcatggcttattatacttgattgttgatgggtttgtcctctgac
tccccatctccacctcccaaaccaattttcaactccttctggaaggacttaattttattcctctctctattacctgacttctacatttaca
tattgtggcacttaatacaattttgtagccttgaataaattgaaatggacttaaacagcagcatgaagcactgaaggacttctgacaa
acggaaaggtcaggggcttctgctggaatagtcagtgagaaaaacttctgtctgggaagaatcgcacaggatgaaggagggt
gccccgaaaaaaactcccataggacttggtcatctcaagaagtctgtaatgcagcccacattagaggagataacaggggatctccta**

ttttcagagttctctgggggaaacctccctctagttcctagggctgtgaggcagcctctctcaggcaaggaggctgaggagaatcccttt
ttatggcctttaaattgaggttccatatctatccctcagagaagtggtctgtgctccctgtttttgtccctctccctcaccacccccacaacatt
ccagcctggggcagggggaggccagtgacacaaaagccctctgtgtatggggtggtatgtgtccccaccctccaccagactat
acaatgccccctctgtccctgcaactgtccccctccccaccactctcaactgcaatgccaggctgcaattggttactggctgaggac
agccccctcatgctggggccctaggggattttaaagcaggttccaggaaccccccggttcagttcctgggtcccccaatttctcaacccccaca
gatgtctccgggccccctgccccgagcaccggctgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgccatc
ctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacc
ctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcaagtctcagccgct
accccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacg
gcaactacaagaccggcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcctcactcaaggagga
cggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaagg
tgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccc
cgtgctgctccccgacaaccactacctgagcaccagctccgccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg
agttcgtgaccggccgggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaaagcggccctagatcaagcttalcgataatcaacctctg
gattacaaaatttgaagattgactggtattcttaactatgtgctcctttacgctatgtggatacgtctttaaagcctttgtatcatgcta
ttgcttcccgtatggctttcattttctccttctataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgt
ggtgtgcaactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgctcagctcctttccgggactttcgctttccccctccc
tattgccacggcggaactcactcggcctgcccgtgctggacaggggtcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgtgct
ggggaaatcactccttccctggctgctcggctgtgttccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttggcctcaa
tccagcggaccttccctcccggcctgctgcccgtctgccccttcccgcttccgcttccgctcagacgagtcggatctccctttg
ggcccctccccgcatcgataccgtcactcgtgatcagcctcactgtgccttctagtggcagccatctgttgttggcccctccccctgc
cttcttgaccctggaaggtccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgg
ggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggatgcggtgggctctatggcttctg
aggcggaaaagaaccagctggggctcactagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacc
cctagtatggagttggccactccctctctgctgctcactgagggcggcgaccaaaggtgcccagcggccggct
ttccccggcgccctcagtgagcagcagcgcgagagcttttgcaaaagcctaggcctcaaaaaagcctcctcactacttctgga
atagctcagaggccgagggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgggcggaaactgggcgg
agttagggcgggatggggcggagttagggcgggactatggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatactctgctgctggggagc
ctggggactttccacacctggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatactctgctgctggggagcctggggactttccacacctaa
ctgacacacattccacagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcac
tgactcgtcgcctcggctgttcggctcggcgagcggatcagctcactcaaaagcggttaatacggttatccacagaatcaggggataac
gcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgttttccataggctccgccc
ccctgacgagcatcacaataatgcagctcaagtgcagaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaa
gctccctcgtgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcatagctca
cgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgcttatcc

ggtaactatcgtcttgagccaaccggaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatg
taggcggtgctacagagttctgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagatatttggtatctgcgctctgctgaagccagtta
ccttcggaaaaagagftggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgca
gaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggtcatgag
attatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatataatgagtaaaacttggtctgacagtacc
aatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgtctgtctatttcggtcatccatagttgcctgactccccgctgtagataactacgatacggg
agggcttaccatctgccccagtgctgcaatgataccgagaccacgctaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccg
gaaggccgagcgcagaagtggctcgaactttatccgctccatccagcttattaattggtgccgggaagctagagtaagtagttcgcca
gtaaatagttgccaacggtgtgaccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtatggcttattcagctccggttcccaacga
tcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtg
ttatcactcatggtatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcatt
ctgagaatagtgtatgcccgcaccgagttgctcttgcggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgtca
tcattggaaaacgttctcggggcgaactctcaaggatctaccgctgtgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatc
ttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacggaaa
tgttgaatactcactcttcttttcaatattatgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaaatgatttagaaaaataa
acaaaatagggttccgcgacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgt
atcacgaggcccttctgctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcacagcttctgtgta
agcggatgccgggagcagacaaggccgctcagggcgcgtcagcgggtgtggcgggtgctggggctggcttaactatcgggcatcagag
cagattgactgagagtgaccattcagcgtctcccttatgcgactctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgtgagca
ccgcccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaac
aagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcgggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgacactgtggcgccg
gtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatctggctagcgtgaccctgctgattggtcgtgaccattccgggtgcccggacg
gcttaccagaaactcagaaggtctccaaccaaacgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccag
atgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgcccgtacaattaatacataaccttatgtatcatacacatacgatttaggtgacacta
tagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор Mprz человека

Подчеркивание = EGFP

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 20: AAV - miniMprz - SH3TC2.мус.ИТР для терапевтической замены гена SH3TC2

tagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctgggcgaccttggctgcccggcctcagtgagc
agcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttctttagttaatgattaaccgcatgctacttatctacgt
agccatgctctaggtaccgctcagggcaaggaggctaagaaggaatccttgcgtgagccttggatttaggttctcagcttatctatcc
ctcagagaagtgtgctatgtccctttctgcccctgectcaccaccccccaacattccaacctagggttagggggaggctcagtatacac
aaagccctctgtgtaaggggtggtatgtgccccccccctaccagagtatacaatgccccttctgctccatgcccctgccaccct
cccaccactctcaattgcacatgccaggctgcaattggcactggctcaggacagccccctcatgctggggatccaggggatttaag
caggttccagaaaacaccactcagttccttgcctcccccgtctctccacccccacagacgctctgccaccggtaccatgggtggctgcttct
gcatccccaggagcggagctgacctgcccggggcccaggtaaagaaactcctccaaggatccaactgtatcgagtgagtgtatagcctcatc
tgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacctgacactctccttctgtgtaagagccgctccaggaggtgtgtaaat
ggaccctacaggaagctgctcggaggcggctctgggcactggagaatgaggaccaggaggtgctgcatgctgttaaggacctctcagc
aaggttggctcagtatccagtctcagagggcccagtttctcatcactcaagaccatggaggaaatctggaagtctccacctaccttaattag
gctacgtatccatgtgtctagaacatctcctcttgaccacaagtactggctcaactgcatattggtggaggatacagagatccaagtgtctgta
gatgataaacacctggaacaatatacctgggactcctgatacaggaaggccacttctctgcagagccctgtgctccgtgactccaccagc
cgagaaggaaaggggaatgcttgacacttgcagaatgagttaatctcagtgaagatggcagaagctggctccgagttggaaggcgtgtct
ttggtgacaggtcagcggggcctggtactggtgctcagccttggagcctctgctctcccttccaccagtgttcttaaagaattatccagga
agctgtggcctttccaggaagaggattggacaggtcctatcagattggcagagagcgtgtaaggccttgacgggttatgagccagga
gaaaaggatgaactgaatttctaccaggagaaagcattgagatcatcggcttctcatacctgggcttcagtgggtcattggaaaagtcgaca
agttcaggacaagtgggcttctccccaccaggaacatagatcctgattcttattccccaatgagcaggaactctgccttctcagtatgagg
agagatgctcctgttggccctgggaagtataagcagactgagtgtccagcttctccacctcttctcgcactgacatcacatctgtcta
ccggctcagtgggttgaatccatccagaatcctccaaatgatctgagtgcacccagcctgaaggttcaaggaggtcaggcctggcagag
cctgggaggagcatcaggccgtgggtccagacagtccagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctcctctcggccacctc
agacagctatccctgccggagcctgatgacctgatgaccggaaactgctcatggacctaaagcactgctcaggaggaggagctgaga
acttgcccccatattgctttctggatcatgagggttatgtgaccacttfaagagtctctatgacttctccttctcttctcacttctcctttat
agcttctctgaggagatgagtttggcctacctggaggcatcaagaaagtggccaagaaagaccacatgacctgggccatgcccgg
ctctgcttctcctgggccggctgagcatcaggaaggtcaaaactctcaggccagggtgtacttgcaggaggccatccacattctcaatgg
agcattgaggacctatccttgggtggccactctgtacatcaattggctgccatctacctgaaacagaggctgagacataaaggctccgccct
gttggaaaaggcaggtgccctgctggcctgctgacctgagctctagtccaagcatgaactgacgtggtggcctacgtgctgctg
ccaggggattgtggtgggcagcagcccgtggaggccaggcctgcttctggccatccgcttctcctgagcctaggccggcacgagg
aggtcctgcccttgcggagcctgcagctcctctctggacacctcctgctctgaggctgtggccagtgtttgagtttctgtatgacaag
aaatatctccacacctgcatggtgctctgtccagcaacatggtatccagagtgccaaaggatgtcttctctatfttggcaggtccacctgt
cctccagaacacaaccaagctccttggcttcttccccaggctgggggtgaagtttctgcttggcctgcccaatgctcagacaggcctgg
ctgctgtgaggaactagcagaccggagcaccagagggccctgtgtctatccttccaaagtgtacctgagcacaggtctcctgacgg
tgcctacctacctgagccaggccttggctagggcagctgctgggtgagcaggaatcctttagcttctctctgcttggcatgggccta
tctcttagccagccaggccaagaaggcttggatgtgcttggccactgctatgctcctgaaggagacagagagctcactcaaagggga
gtcatctataacctcctgggacttgcactccaaggtgaaggccgggtgaacaggcagccaagagctatcttggcccttgaacagagcc

caggagggtgggagatgtgcataaccaggcagtggtatggccaatcttggccacctgagccttaagtctgggctcagcatccagccaga
aactatctctgcaggctgtacgactctattgtgaactcaggccaagtaaggagacagacatggaattagtagcaggtgttctctggttggcc
aagttctggtgtctggacaccagctgacccatggccttctttgtatgaaatggcattgctgtttggcttaaggcatcgacatctaaagagtcag
cttcaggccacaaatcctctgccatttctacagctctgtgtcccaaacctgaggcatgcatcacctaccatgagcactggctggccctg
gctcagcaactcagggaccgggagatggaaggaggctgctggagtccctggggcagctttatcggaacctaaataccgccaggtccct
caggaggtcactcacatgcatcaaggagagcctgctgtatcttattgacctgggggagacagacaaggctgctgaggcctggcttggggc
ggggcgactccactacctcatgcaggaagacgagctggtggagctgtgctgcaggcagccatccagacagccctgaagtcaaggag
cctttgctggctctcaaactttatgaagaagcaggtgatgtgttctcaatgggaccgccacaggcatcatgcagtggagtactaccgagct
ggagctgttcttttagcaaggaggtgaaaggcgtgagaactgagctccggatttcaataagctgacagagctgcagattagcctcgaag
gctatgagaaggctttggaatttgcaccctggccggcaggtcagcacagtcacaggagatcagaggcaagagctggtggcctttacc
gcctggctacagtgtactactccctgcacatgtatgagatggctgaggactgctacctgaagacctgtccctgtccaccatggctgcaga
gtcccaaggaggccctgtactatgccaaggtgtattatcgctgggcagactcaccttctgccagctgaaggatgccatgatgccactgag
tacttcttctggccctggcagcagcggctctgctgggtgatgaggagcttcaggacaccattaggagcaggctggacaacatctgccaga
gccccctgtggcacagcagggccctccgggtgctcctcagagagggcgcggtggctgagtgggtggctggccctcgagcagaagct
gatcagcgaggaggacctgtaagatatccatcacactggcggccgaggactctcgagagggcctaataaagagctcagatgcatgat
cagagtggtgggtttttgtgtgagatctaagcttagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaac
ccctagtgtagggtggccactccctcttgcgcgctcgtcgtcactgaggccggggcaccaaaggtcgcccagccccggc
tttggccccggggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagctttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctactacttctgg
aatagctcagaggccgaggcggcctcgccctctgcataaataaaaaaattagtcagccatggggcgagaaatgggcggaactggggc
gagttagggcgggatggggcgagttagggcgggactatggttctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctcctgctgggga
gcctggggactttccacacctggttctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctcctgctggggagcctggggactttccacacct
aactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgggggagagggcgtttgctattgggcgcttccgcttctcgtc
actgactcgtcgcctcggtcgttggctcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggggata
acgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttctggcggttttccataggctccgc
ccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacagactataaagataaccaggcgtttccccctgga
agctccctctgctcgtctctgttccgacctgccgcttaccggataacctgtccgctttctccctcggaagcgtggcgctttctcatagctc
acgctgtaggtatctcagttcggttaggtcgttcccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcctgctgccttacc
cggttaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacagacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtat
gtaggcgggtctacagagttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagtt
acctcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgc
agaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctcggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctatga
gattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaaacttggctgacagttac
caatgcttaatcagtgaggacctatctcagcgatctgtctatcttctcatcctatgctgactccccgctgtgtagataactacgatacgg
gagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagcc
ggaaggccgagcgcagaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagtctattaattgttccgggaagctagagtaagtagttcgcc

agftaatagtttgcgcaacggttggcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggtccaacg
atcaaggcgagttacatgatccccatggtgtcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagt
gttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctfactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtagtactcaaccaagtca
ttctgagaatagtgatgctggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgctc
atcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgat
cttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaa
atgttgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaata
aacaatagggggtccgcgacatttccccgaaaagtccacactgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggc
gtatcacgaggcccttctcgtcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttctgtg
aagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggcgcgctcagcgggtgtggcgggtgctggggctggcttaactatgcggcatcaga
gcagattgactgagagtgaccattcagcgtctccttatgcactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggccttgagc
accgcccgcgaaggaatggtgatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaa
caagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcggtgatgctggcgatataggcggcagcaaccgcactgtggcgcc
ggtgatgccggccacgatgctcggcgtagaggatctggctagcgtgaccctgctgattggtcgtgaccatttccgggtgcgggac
ggcgttaccagaaactcagaaggctcgaaccaaacaccactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagcca
gatgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgcggtcacaattaatacataacctatgtatcacatacagatttaggtgacact
atagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор mini Mpz

Подчеркивание = SH3TC2

Курсив с подчеркиванием = синтетический минимальный полиА

SEQ ID NO. 21: AAV - miniMpz человека - SH3TC2

**tagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaaagcccgggctcggggcaccctttggctgcccggcctcagtgagcg
agcagcgcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggtcctttagttaaagtaaacccgcatgctacttatctactg
agccatgctctaggtacctctcaggcaaggagctgaggagaaatccccctttatggcctttaaattgaggttccatctatccctcag
agaagtggtctgtgctccctgttttgcctctccctcaccacccccacaacattccagcctggggcagggggagggcagtgggacaca
aagccctctgtgtatggggtggatgtgctcccccaaccctccaccagactatacaatgccccttctgctccctgcaactctgccccctcc
ccaccacctcacaactgcatgcccaggctgcaattggctactggctgaggacagccccctcatgctggggccctaggggatttaagc
aggttccaggaacccccgttcagttcctggctccccactttctcaacccccagatgctccgggccccctgccccgcccagcgggtacc
atgggtggctgcttctgcatccccaggagcggagctgacccggggcccaggtaaagaaactcctccaaggatccaactgtatcgagt
agtgtatagcctcatctgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacctgacactctccttctgtgtaaagagccgctcc
aggaggtgtgtaaattggacccttacaggaagctgctcggaggcggctctgggactggagaatgaggaccaggaggtgcgcatgctgtt**

taaggacctctcagcaaggfttgctcagtatccagctcagagggcccagtttctcatcacctcaagaccatggaggaaatctggaagttctc
cacctacctaatttaggctacgtatccatgtgtctagaacatctctctttgaccacaagtactggctcaactgcatattggtggaggatacaga
gatccaagtgtctgtagatgataaacacctggaacaatatacctgggactcctgatacaggaaggccacttctctgcagagccctgtgctc
cgtgactccaccagccgagaagggaagggaatgcttgacactttgcaagaatgagttaatctcagtgaaagatggcagaagctggctccga
gttggaaaggcgtgtctttggtgacaggtcagcggggcctggactgggtgcagccttgaggcctctgcctctcccttccaccagtggttccta
aagaattatccaggaagctgtgcttccaggaagaggattggacaggtcctatcagattggcagaggacgctgtaaggccttgacgg
gttatgagccaggagaaaaggatgaactgaatttctaccagggagaaagcattgagatcatcggtttgcatacctgggcttcagtggttca
ttggaaagtgcacaagttcaggacaagtgggctttgtcccaccaggaacatagatcctgattcttattcccacatgagcaggaactctgcctt
tctcagtgatgaggagagatgctccctgttggccctgggaagtataagcagactgagtggtccagcttctccacacttctgctgcactga
catcacatctgtctaccggctcagtggtttgaatccatccagaatcctccaatgatctgagtgcatccagcctgaaggttcaaggaggtc
aggcctggcagagcctgggaggagcatcaggccgtgggtccagacagctcagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctc
ctctcggccacctcagacagctatcgctgccggagcctgatgacctgatgacctggaactgctcatggacctaaagcactggtcaggagg
aggaggctgagaactcgccccatattggctttctggatcatgagggttatgctgacctttaagagtctctatgacttctcttcttcttct
cacttctctttatagcttctctgaggaggatgagtttggcctacctggaggcatcaagaaagtgggccaagaagagccacatgacctg
ggcccatgcccggctctgcttctctgggccggctgagcatcaggaaggtcaactctctcaggccagggtgacttccagggagccatc
cacatttcaatggagcatttgaggacctatccttgggtggccactctgtacatcaatttggctgccatctacctgaaacagaggctgagacata
aaggctccgcccctgttggaaaaggcaggtgccctgctggcctgctgacctgacctagtctagtgccaagcatgaactcgactggtgg
cctacgtgctgcccaggggattgtggtggcagcagcccgtggaggccaggcctgttctggccatccgcttctcctgagcctag
ggcggcacgaggaggctcctgccccttccggagcgcctgcagctcctctctggacacctcctgctctgaggctgtggccagtgtttgagt
tttctgtatgacaagaatatctccacaccttgcaagtgccctctgtccagcaacatggatccagagtcccgaaggatgtcttctcttattgg
caggctccacctgtcctccagaacacaaccaagctccttggcttctctcccaggctgggggtgaagtttctgccttggcctgcccacatgctca
gacaggccctggctgctgtgaggaactagcagaccggagcaccagaggccctgtgtctcatcttccaaagtgtacctcagcaca
ggctcctgacgggtgccatccactacctgagccaggccttgggtctagggcagctgctgggtgagcaggaatccttgagtcttctctgcc
tggcatggcctatctcttagccagccaggccaagaaggcttggatgtgcttgaccactgctatgctccctgaaggagacagagagtctc
actcaaaggggagtcatctataacctcctgggacttgcactccaaggtgaaaggccgggtgaaagggcagccaagagctatcttggggcc
ttgaacagagcccaggaggtgggagatgtgcataaccaggcagtggtatggccaatcttggccacctgagccttaagtctgggctcag
catccagccagaaactatctctgcaggctgtacgactctatttgaacttcaggccaagtagagacagacatggaattagtagaggtgtt
ctctggttggccaagttctggtgtctggacaccagctgacctatggccttcttattgaaatggcattgctgttggcttaaggcatcgacat
ctaaagagtcagctcaggccaccaatccctctgcaatttctacagctctgtgtccccaaacctgaggcatgcatcacctaccatgagcac
tggctggccctggctcagcaactcagggaccgggagatggaaggaggctgctggagctcctggggcagctttatcggaacctaaatac
cgccaggtccctcaggaggtcactcacatgcatcaaggagagcctgcgtatcttattgacctgggggagacagacaaggctgctgaggc
ctggcttggggcggggcactccactacctatgcaggaagacgagctggtggagctgtgctgagggcagccatccagacagccctga
agttagaggagccttctgctgctcaaaactttatgaagaagcaggtgatgttcttcaatgggacctggccacaggtcatgcatgaggtgag
tactaccgagctggagctgttctttagcaaggaggtgaaaggcgggtgagaactgagctccggatttcaataagctgacagagctgcagat
tagcctcgaaggctatgagaaggcttggaaattgccaccctggccggcaggctcagcacagtcacaggagatcagaggcaagagctggt

ggccttcaccgcctggctacagtgtactactccctgcacatgtatgagatggctgaggactgctacctgaagaccctgtccctctgtccacc
atggctgcagagtcccaaggaggccctgtactatgccaaaggtgtattatcgctgggcagactcaccttctgccagctgaaggatgccatg
atgccactgagfacttcttctggccctggcagcagcggctctgctgggtgatgaggagcttcaggacaccattaggagcaggctggacaa
catctgccagagccccctgtggcacagcagccctccgggtgctcctcagagagggcgcgggtggctgagtggtggctggcctggcctct
gagcggccgcggagctctcgagaggcctaataaagagctcagatgcatcagatcagagtggtgggtttttgtgtgagatctaagcttag
catggctacgtagataagtagcatggcgggttaacttaactacaaggaacccttagtgatggagttggccactccctctctgccc
gctcgtcgtcactgaggccggggcaccaaaggtcggccgacggcgggctttgcccggggggcctcagtgagcagcagcagc
cgagagcttttgc aaaagcctaggcctccaaaaagcctcctactacttctggaatagctcagaggccgagggcctggcctctgc
ataaataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttagggggcgggatgggcggagttagggggcg
gactatggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctggtgctgactaattga
gatgcatgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctaaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcggc
caacgcgcggggagagggcgggttgcgtattgggcgctcttccgctcctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttcggctgcggcgag
cggatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaa
aaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtc
agagtgggcgaaccggacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgtt
accggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctc
caagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcgtgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacac
gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggtatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtgggtggccta
actacggctacactagaagaacagatatttggtatctgcgctcgtcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatccggca
aacaaccaccgctggtagcgggtgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttct
acggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaatta
aaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtctg
tctatttcgtcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgatac
cgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttat
ccgctccatccagctatattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgcagtaataagtttgcgcaacgttggccattgctacaggc
atcgtggtgtcacgctcgtcgtttggatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatgttggcaaaaa
agcggtagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttac
tgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccgcgaccgagttgctcttggc
cggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcatattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaagg
atcttaccgctgttgagatccagttcagatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagca
aaaacaggaaggcaaaatgcccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatggtgaatactcactcttcttttcaatattattgaagc
atttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtg
ccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgtcgcgcgttccggatga
cgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggctcacagcttctgtaagcggatccggggagcagacaagcccgtcagggcg
cgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcagcgtctccctt

atgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgtgagcaccgcccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatgg
cgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttc
cccatcgggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatct
ggctagcgatgaccctgctgattgggtcgtgaccatttccgggtcggggacggcgttaccagaaactcagaaggttcgtccaaccaaac
gactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacg
cggctacaattaatacataaccttatgtatcatacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор мини hP0 человека

Подчеркивание = SH3TC2

Курсив с подчеркиванием = синтетический минимальный полиА

SEQ ID NO. 22: минимальный промотор hP0 человека

tctctcaggcaaggaggtgaggagaaatcccttttatggccttaaattgaggtccatatctatccctcagagaagtgtgtctgtcctgt
ttttgtccctctccctcaccacccccacaacattccagcctggggcagggggaggccagtggacacaagccctctgtgtatgggggtgt
atgtgtccccaccctccaccagactatacaatgccccttctgctccctgcactctgccccctccccaccctctcaactgcacatgc
caggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgctggggccctaggggattttaagcagggtccaggaacccccgttcagttc
ctggccccactttctcaaccacagatgctcggggccccctgccccctgccccagc

SEQ ID NO. 23: AAV - miniMpz человека - Egfp

tagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaagcccgggctcgggcgaccttggctgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggtggccaactccatcactaggggttctttagttaatgattaaccgcatgctacttatctactg
agccatgctctaggtacctctcaggcaaggaggtgaggagaaatcccttttatggccttaaattgaggtccatatctatccctcag
agaagtgtgtctgtcctgtttttgtccctctccctcaccacccccacaacattccagcctggggcagggggaggccagtggacaca
aagccctctgtglatgggtgglatgtgtccccccccccaccagactalacaatgccccttctgtccccctgcaactctgccccctcc
ccaccacctcaactgcacatgccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgctggggccctaggggattttaagc
aggtccaggaacccccgttcagttcctgggtccccactttctcaaccacagatgctcggggccccctgccccctgccccagcaccggt
cgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtggtgccatcctgctcagctggacggcgacgtaaacggccacaag
ttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcc
ctggccccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgcaagtctcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtcc
gcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcacctcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcccggaggtgaagttcgagg
gcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaacta
caacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggca
gctgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatggcgacggccccgtgctgctgccccgacaaccactacctgagcaccca
gtccgcccctgagcaagaccacaagagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggcatgg
acgagctgtacaagtaaacggccctagatcaagcttctgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaagattgactggattctta

aciatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgccttggatcatgctattgctcccgatggcttccattttctcctccttgataa
atcctgggtgctgctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcggtgtgcaactgtgttggctgaeccaacccccactg
gtggggcattgccaccacctgacgctccttccgggacttgccttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgecttg
cccgtgctggacaggggctcggtgttgggcaactgacaattccgtgggtgtgctggggaatcatcgctccttcccttggctgctgectgt
gtgccacctggattctgcgctgggacgctccttctgctacgtcccctcggccctcaatccagcggaccttccctcccgccgctgctgcccg
ctctgcccctcttccgctcttgccttgccttgcctcagacgagtcggatcctcccttgggcccctccccgcatcgataccgtcgactcgctg
atcagcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgttgttgcctcccccctgccttccctgacctggaaggtgccactcccactgtcc
ttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaaggggggag
gattgggaagacaatagcaggcatgctgggatgctgggtggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctcgactagagc
atggctacgtagataagtagcatggcgggtaataactacaaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcg
ctcgtcgtcactgaggcggggcaccaaaagtcgcccagcggggcttggccggggcctcagtgagcggagcggagcgc
gcagagcttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgca
taaataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgggaggaaactgggaggagtagggggcgggatgggaggagttagggggcggg
actatggtgctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctggtgctgactaattgag
atgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctaaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgcc
aacgcgcggggagaggcgggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttccggctcgggcggagc
ggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaa
aggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtca
gaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctggaagctccctcgtcgcctcctctgttccgacctgcccgtta
ccggatacctgtccgcttctcccttccggaaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgaggtcgttccgctcc
aagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtcaaacccgtaagacacg
acttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcggaggtatgtagggcggctacagagttctgaagtgggtggcctaa
ctacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccctcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaa
acaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttggatcttttcta
cggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaattaa
aatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacctggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgt
ctattcgttcatccatagttgcctgactcccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgatac
cgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtgtcctgcaactttat
ccgctccatccagcttattaattgttccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggc
atcgtggtgtcacgctcgtcgttggatggcttccatcagctccggttcccacgatcaaggcaggttacatgatccccatgttgtgcaaaaa
agcggtagctccttccgctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgaggttactcatggttatggcagcactgcataattctcttac
tgtcatgccatccgtaagatgcttctgtgactggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccggcagcaggtgctcttggc
cggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaagtctcatattgaaaacgttcttccggggcgaaaactctcaagg
atcttaccgctgtgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttacttccaccagcgttctgggtgagca
aaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttcttcaatattattgaagc

atttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtg
ccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttcgtctcgcgcgtttcggatga
cggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctgttaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcg
cgtcagcgggtgtggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccattcagcgtctccctt
atgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgtgagcaccgcccgcaaggatggtgcatgcaaggagatgg
cgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttc
cccatcgggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatct
ggtagcggatgacctgctgattggttcgctgaccattccgggtcgggacggcggttaccagaaactcagaaggttcgtccaaccaaac
gactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacg
cggctacaattaatacataaccttatgtatcatacacatagcatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Жирный шрифт = последовательность ИКП

Курсив = промотор мини hP0 человека

Подчеркивание = EGFP

Курсив с подчеркиванием = последовательность WPRE

SEQ ID NO. 24: минимальная синтетическая последовательность поли А

ggagctctcagagggcctaataaagagctcagatgcatcgatcagagtgtgttggtttttgtgtgagatct

Примеры

Далее данное изобретение будет описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Пример 1: клонирование плазмиды переноса AAV

Векторы AAV конструировали с целью обеспечения специфичной в отношении шванновских клеток экспрессии Cx32 (pAAV - Mpz.GJB1, полный вектор) или репортерного гена EGFP (pAAV - Mpz.Egfp, контрольный вектор), оба под контролем промотора Mpz размером 1,127 т. п. о., которые, как показано, управляют специфичной экспрессией в шванновских клетках (26, 32). Данные векторы клонировали с использованием в качестве исходной плазмиды конструкции AAV pAM/Mbr - EGFP - WPRE - bGH (57), содержащей посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) и последовательность полиаденилирования гормона роста быка (bGHrA), фланкированную AAV2-инвертированными концевыми повторами (фиг. 1 и фиг. 9).

Конкретные подробности того, каким образом клонировали три конструкции, AAV - Mpz.Egfp, AAV - Mpz.GJB1 и AAV - miniMpz.Egfp, следующие:

264 - P0 - EGFP - WPRE (= AAV - Mpz.Egfp – SEQ ID NO. 1)

Плазмиду pBluescript SK+, содержащую промоторную последовательность Mpz, применяли для расщепления промоторной последовательности с использованием рестрикционных ферментов XhoI и EcoRV. Вектор AAV также расщепляли с использованием тех же ферментов. После лигирования и трансформации правильность сборки экспрессионной кассеты подтверждали с помощью картирования рестрикционным расщеплением и прямого секвенирования с использованием праймеров, покрывающих всю кодирующую последовательность.

264 - Mpz(P0) - Cx32 - WPRE (= AAV - Mpz.GJB1 – SEQ ID NO. 2)

ОПС Mpz/Cx32 амплифицировали с помощью ПЦР из ранее созданной лентивирусной конструкции. Праймеры, использованные для амплификации, представляли собой P0 - Cx32 - F 5'-AGGGGTACCCTTCCTGTTTCAGACT-3' (SEQ ID NO. 13) и P0 - Cx32- R 5'-CCGCTCGAGGGATCCTC AGCAG-3' (SEQ ID NO. 14). Продукт ПЦР (2030 п. о.) очищали из геля с использованием набора для гель-экстракции от Qiagen и расщепляли с помощью KpnI и XhoI. Вектор AAV также расщепляли теми же рестрикционными ферментами. Полную экспрессионную кассету подтверждали с помощью прямого секвенирования ОПС.

264 - Mpz(P0) mini - EGFP - WPRE (= AAV - miniMpz.Egfp – SEQ ID NO. 3)

Вектор 264 AAV расщепляли с помощью HindIII и самолигировали. Затем в данный вектор вставляли линкер. Mpzmin амплифицировали с помощью ПЦР из последовательности промотора Mpz крысы с использованием следующих праймеров: KpnI - P0 - F: 5'-GGGGTACCGCTCTCAGGCAAG-3' (SEQ ID NO. 15) и AgeI - P0 - R: 5'-AAACCGGTTGGCAGAGCGTCTGT-3' (SEQ ID NO. 16). Затем указанную вставку (420 п. о.) направленно клонировали в наш вектор AAV 264. EGFP расщепляли из другой конструкции с использованием AgeI и HindIII и непосредственно лигировали в данный вектор.

Пример 2: получение, очистка и определение концентрации вектора AAV

Получение векторов AAV9 проводили в соответствии с опубликованными протоколами (58). Плазмиды pAAV - Mpz.Egfp и pAAV - Mpz.GJB1 перекрестно упаковывали в капсид

AAV9 (плазмиды капсида предоставлены доктором А. Бош (Dr. A. Bosch), Университет Барселоны, Испания, и первоначально были разработаны доктором Джеймсом Уилсоном (Dr. James Wilson), компания Vector Core при Университете Пенсильвании, штат Пенсильвания, США).

Запасы вируса AAV для псевдотипов 9 получали так, как описано ранее (59). Рекомбинантные векторы AAV (rAAV) получали с помощью тройной трансфекции 2×10^8 клеток HEK293 250 мкг rAAV, 250 мкг pRepCap и 500 мкг плазмиды pXX6, смешанных с полиэтиленимином (ПЭИ; разветвленный, мол. масса 25000; Sigma). Кратко, через 48 часов после трансфекции клетки собирали с помощью центрифугирования (при 200 g, 10 мин); ресуспендировали в 30 мл 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ и 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), и лизировали тремя циклами замораживания – оттаивания. Клеточный лизат осветляли с помощью центрифугирования (при 2000 g в течение 10 мин), и частицы rAAV очищали от надосадочной жидкости с помощью йодиксанолового градиента следующим образом: осветленный лизат обрабатывали бензоазой в концентрации 50 Е/мл (от Novagen; в течение 1 ч при температуре 37°C) и центрифугировали (при 3000 g в течение 20 мин). Надосадочную жидкость, которая содержала указанный вектор, собирали и доводили до 200 mM NaCl, используя базовый 5 M раствор. Для осаждения вируса из осветленного клеточного лизата добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ 8000; Sigma) до конечной концентрации 8%, смесь инкубировали (в течение 3 ч при температуре 4°C) и центрифугировали (при 8000 g в течение 15 мин). Осажденный материал, содержащий rAAV, ресуспендировали в 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ и 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), и инкубировали в течение 48 ч при температуре 4°C. Частицы rAAV очищали с помощью йодиксанольного метода так, как описано в (59). При необходимости rAAV концентрировали и обессоливали в PBSMK с использованием центробежного фильтрующего устройства Amicon Ultra-15 (от Millipore). Концентрацию оценивали с помощью количественного анализа с пикогрином (60) и рассчитывали в единицах вирусного генома на миллилитр (вг/мл).

Пример 3: интратекальная доставка вектора

Осуществляли небольшой разрез кожи вдоль нижнего уровня поясничного отдела позвоночника для визуализации позвоночника и доставляли вектор AAV в межпозвонковое пространство L5 - L6 анестезированных мышей с низкой скоростью, составляющей 5 мкл/мин. Шприц Гамильтона на 50 мкл (Hamilton, г. Джармата, Румыния), соединенный с иглой 26-го калибра, использовали для инъекции общего объема 20 мкл, содержащего

$0,5 \times 10^{11}$ - 1×10^{11} векторных геномов (вг) вектора AAV. Взмах хвоста считали показателем успешного интратекального введения.

Пример 4: AAV9-опосредованная экспрессия гена, нацеленная на шванновские клетки

Мышам дикого типа возрастом 2 месяца вводили вектор AAV9 - Mrz - Egfp, описанный в примерах 1 и 3 выше. Образцы анализировали путем выделения ДНК из тканей ПНС и определения присутствия вирусной ДНК, измеренного в виде числа копий вектора (ЧКВ) через 4 недели и 6 недель после инъекции (таблица 1) так, как мы описали ранее (33). Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов поясничных корешков и иммуноблот поясничных корешков, бедренных нервов и седалищных нервов также проводили так, как описано ниже, через 4 недели и 8 недель после инъекции (таблица 2).

Иммунофлуоресцентное окрашивание: для иммуноокрашивания мышей анестезировали авертином в соответствии с ведомственно утвержденными протоколами, а затем транскардиально перфузировали физиологическим раствором с последующим введением свежего 4% параформальдегида в 0,1 М фосфатно-солевом буфере. Препарировали пояснично-крестцовый отдел спинного мозга с прикрепленными корешками, а также двусторонние седалищные и бедренные двигательные нервы. Все ткани замораживали для получения криосрезов, а седалищный и бедренный нервы изолировали и разделяли на волокна под стереоскопом. Разделенные волокна или срезы пермеабилizировали в холодном ацетоне и инкубировали при комнатной температуре с блокирующим раствором 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma-Aldrich, г. Мюнхен, Германия), содержащим 0,5% Тритона-X (Sigma-Aldrich, г. Мюнхен, Германия), в течение 1 ч. Использовали следующие первичные антитела: моноклональное антитело мыши против контактин-ассоциированного белка (Caspr, 1 : 50; подарок от доктора Элиора Пелеса (Dr Elior Peles), Институт имени Вейцмана), антисыворотки кролика против EGFP (1 : 1000; Invitrogen, США), против Caspr2 (1 : 200, Alomone Labs, Израиль) и против Cx32 (1 : 50; Sigma, г. Мюнхен, Германия) – все разведенные в блокирующем растворе, и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Затем образцы промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и инкубировали со вторичными антителами мыши и кролика, очищенными перекрестной аффинностью и конъюгированными с флуоресцеином и родамином (1 : 500; Jackson ImmunoResearch, США) в течение 1 часа при комнатной температуре. Ядра клеток визуализировали с помощью окрашивания DAPI (1 мкг/мл; Sigma, г. Мюнхен, Германия). Срезы помещали в флуоресцентную заливочную среду, а изображения фотографировали

под флуоресцентным микроскопом с помощью цифровой камеры с использованием программного обеспечения Axiovision (Carl Zeiss MicroImaging; г. Оберкохен, Германия).

Уровни экспрессии репортерного гена *Egfr* определяли количественно путем подсчета числа EGFP-положительных шванновских клеток в процентах от общего числа шванновских клеток в поясничных корешках и в седалищных нервах. Экспрессию *Cx32* количественно оценивали путем визуализации узловых областей миелинизированных волокон с маркерами аксональных доменов, включая юкстапаранодальный *Kv1.2* и паранодальный *Caspr* при двойном окрашивании с помощью *Cx32*. Число узловых областей, положительных по иммунореактивности с *Cx32*, подсчитывали как процент от общего числа узловых областей в поясничных корешках и в седалищном нерве.

Иммуноблот-анализ: иммуноблот-анализ лизатов корешков и периферических нервов применяли для обнаружения экспрессии репортерного гена *Egfr* или *Cx32* в тканях мышей, которым проводили инъекции. Иммуноблоты лизатов поясничных корешков, бедренных и седалищных нервов, собранные через 4 недели после инъекции, инкубировали с первичным антителом кролика против *Egfr* (1 : 1000; Abcam) и с первичным антителом кролика против *Cx32* (клон 918, 1 : 3000), с последующим введением конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) вторичных антител против кролика (Jackson ImmunoResearch, разведение 1 : 3000). Связанное антитело визуализировали с помощью системы усиленной хемилюминесценции (от GE Healthcare Life Sciences).

Результаты показаны на фиг. 2, в таблице 1 и в таблице 2 ниже. Удалось обнаружить высокие уровни экспрессии репортерного гена EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок), особенно в шванновских клетках – миелинизирующих клетках ПНС, включая корешки поясничных спинномозговых нервов и дистальные отделы седалищных нервов, и это показывает специфическую экспрессию репортерного гена EGFP в образцах поясничных корешков и седалищных нервов, и указывает на то, что с помощью указанной системы доставки вектора достигается тканеспецифическая экспрессия в шванновских клетках.

Таблица 1: число копий вектора (ЧКВ) во всех тканях, исследованных у мышей ДТ, которым вводили AAV9 - *Mpz.Egfp*

	4 недели	6 недель	8 недель
--	-----------------	-----------------	-----------------

	Поясничные корешки	Проксимальные седлищный нерв	Дистальные седлищный нерв	Поясничные корешки	Проксимальные седлищный нерв	Дистальные седлищный нерв	Поясничные корешки	Проксимальные седлищный нерв	Дистальные седлищный нерв
ЧК	2,66 ±	0,31 ±	0,07 ±	0,62 ±	0,23 ±	0,02 ±	0,24 ±	0,82 ±	0,18 ±
В	1,37	0,13	0,03	0,28	0,13	0,01	0,1	0,45	0,08
Н, число мышей	4	2	4	4	4	4	3	4	4

Таблица 2: уровни экспрессии EGFP (% Egfp-положительных шванновских клеток) в поясничных корешках и седлищных нервах мышей ДТ, которым вводили AAV9 - *Mrz*.EGFP, через 4 и 8 недель после введения

	Седлищный		Корешки	
	4 недели	8 недель	4 недели	8 недель
Экспрессия EGFP	53,6 ± 7,66	39,9 ± 2,49	29,7 ± 1,89	35,0 ± 3,23
N	4	3	4	3

Пример 5: экспрессия вектора AAV9 - *Mrz*.GJB1, доставленного интратекально, у двухмесячных мышей с НГ Сх32 и R75W

Вектор AAV9 - *Mrz*.GJB1 получали так, как описано в примере 1 выше (5×10^{12} вг/мл), и вводили мышам НГ Сх32 возрастом 2 месяца и 6 месяцев с помощью поясничной интратекальной (и/т) инъекции (5×10^{10} вг в 20 мкл). Анализ ЧКВ из ДНК, экстрагированной из тканей ПНС, проведенный так, как описано ранее в (33), на клетку в различных тканях выявил широкое биораспределение (фиг. 3А), в том числе в спинномозговых корешках и седлищных нервах, с наибольшими уровнями в печени (55). Иммуноокрашивание и иммуноблот-анализ проводили так, как описано выше. Сх32 экспрессировался в паранодальных участках миелина в более чем 60-70%

миелинизирующих шванновских клеток в поясничных корешках спинного мозга и в волокнах седалищного нерва (фиг. 3B-D). Высокие уровни экспрессии AAV9-доставленного Cx32 также выявили с помощью вестерн-блоттинга лизатов ткани ПНС у мышей НГ Cx32, которым вводили указанный вектор, но не у мышей, которым указанный вектор не вводили (фиг. 3F).

Чтобы выяснить, может ли вирусный вектор AAV9 - *Mrz.GJB1*, обеспечивающий более высокие уровни экспрессии, преодолеть интерферирующие эффекты удерживаемых в аппарате Гольджи мутантов, наблюдаемые с лентивирусным вектором в наших предшествующих исследованиях (29, 34), авторы данного изобретения также вводили указанный вектор AAV двухмесячным мышам с нокаутом R75W (НГ R75W). Важно отметить, что паранодальную локализацию AAV9-доставленного Cx32 также обнаружили в тканях R75W/НГ, с типичной перинуклеарной локализацией (фиг. 3E), несмотря на коэкспрессию интерферирующего мутанта R75W, удерживаемого в аппарате Гольджи. Таким образом, AAV9 демонстрирует потенциал для обеспечения высоких уровней широкой и нацеленной на шванновские клетки экспрессии гена, которая также может преодолевать интерферирующий эффект репрезентативного мутанта ШМТ1Х, удерживаемого в аппарате Гольджи.

Эти результаты показаны на фиг. 3 и в таблицах 3 и 4 ниже, демонстрируя, что использование указанных векторов для доставки копий гена GJB1 дикого типа приводит к успешной экспрессии Cx32 как у мышей с нокаутом Cx32, так и у мышей с нокаутом R75W. Удерживаемый в аппарате Гольджи мутант R75W (фиг. 3E) также достигает экспрессии Cx32, несмотря на присутствие мутантного белка R75W Cx32 в перинуклеарных областях, тогда как этого было невозможно достичь в предыдущей работе без использования вектора AAV.

Таблица 3: число копий вектора во всех тканях, исследованных у мышей НГ Cx32 КО, которым вводили AAV9 - *Mrz.GJB1*

	Поясничные корешки	Седалищный нерв	Мышца	Спинальный мозг
ЧКВ	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,05 ± 0,03	0,17 ± 0,08
N	12	12	3	5

Таблица 4: уровни экспрессии Cx32 (% Cx32-положительных паранодальных миелиновых областей) в поясничных корешках и седалищных нервах трансгенных мышей НГ Cx32 и Cx32 KO/R75W возрастом 2 месяца и 6 месяцев, которым вводили AAV9 - *Mrz.GJB1*

	Седалищный			Поясничные корешки		
	НГ, 2 мес	НГ, 6 мес	НГ R75W	НГ, 2 мес	НГ, 6 мес	НГ R75W
Экспрессия Cx32	71,5 ± 5,8	71,7 ± 6,0	73,2 ± 5,1	63,1 ± 3,1	62,7 ± 8,1	64,9 ± 3,8
N	6	3	6	6	3	6

Пример 6: поведенческое исследование мышей НГ Cx32, получавших инъекции вектора AAV9 - *Mrz.GJB1* (полного), в возрасте 6 месяцев, по сравнению с мышами из того же помета, получавшими AAV9 - *Mrz.Egfp* (контрольный вектор)

Виды воздействия на мышей. Испытания генной терапии проводили с использованием двух групп мышей с нокаутом гена Cx32 (НГ) в возрасте 6 месяцев. По меньшей мере 8 - 12 мышей на группу воздействия для каждого измеренного результата считали достаточным для оценки статистически значимых различий на основании предшествующих исследований с использованием аналогичных моделей (32, 33). На животных воздействовали в возрасте 6 месяцев после начала патологии (известно, что она начинается после 3 месяцев).

Мыши из одного помета рандомизировали для воздействия либо вектором AAV9 - *Mrz.GJB1* (полный вектор), либо вектором AAV9 - *Mrz.Egfp* (контрольный вектор, контрольная группа), и присваивали им кодовый номер для дальнейшей идентификации.

Поведенческое исследование: затем мышей оценивали с помощью поведенческого исследования так, как изложено ниже, до воздействия, и снова в возрасте 8 месяцев и 10 месяцев, исследователем, заслепленным относительно условия воздействия (фиг. 4 и таблица 5).

Тест ротарод: двигательный баланс и координацию определяли так, как описано ранее (61), с использованием ускоряющейся установки ротарод (Ugo Basile, г. Варесе, Италия). Дрессировка животных состояла из трех испытаний в день с 15-минутным периодом отдыха между испытаниями в течение 3 суток подряд. Мышей помещали на стержень-ротарод и

постепенно увеличивали скорость с 4 оборотов в минуту (об/мин) до 40 об/мин. Тест проводили на четвертые сутки с использованием двух разных скоростей – 20 об/мин и 32 об/мин. Для каждой скорости рассчитывали продолжительность времени до падения. Тест длился до тех пор, пока мышь не упала со стержня или после того, как мышь оставалась на стержне в течение 600 с, а затем удалялась с него. Каждую мышь помещали на ротарод по три раза при каждой используемой скорости, и для каждой скорости получали три различных значения. Использовали средние значения для каждой мыши при двух разных скоростях.

Тестирование силы хвата: для измерения силы хвата мышей держали за хвост и опускали к устройству (Ugo Basile, г. Варесе, Италия) до тех пор, пока они не хватали сетку задними конечностями. Мышей осторожно тянули назад, пока они не освобождали сетку. Оборудование отображало измерения силы в г. Каждый тест состоял из трех последовательных испытаний, и результаты полученных измерений усредняли. Силы хвата задних конечностей сравнивали между мышами, получавшими AAV9.Mpz - GJB1, и мышами, получавшими AAV9.Mpz - Egfp.

Более старые мыши НГ Сх32, получавшие полный терапевтический вектор AAV9 - Mpz.GJB1, показали значительно лучшие результаты в этих тестах по сравнению с мышами того же помета, которым вводили контрольный (нетерапевтический) вектор AAV9 - Mpz.Egfp (n = 20 мышей на группу).

Результаты представлены на фиг. 4 и в таблице 5 ниже, и показывают, что двигательные способности (измеренные как с помощью теста ротарод, так и с помощью исследования хвата задней конечности) в группе, получавшей GJB1, улучшились через 2 месяца после инъекции (в возрасте 8 месяцев), и что это улучшение осталось стабильным до возраста в 10 месяцев. Мыши, которым вводили контрольный вектор, не продемонстрировали улучшения двигательных способностей.

Таблица 5: сравнение динамики показателей двигательных способностей в группах воздействия на мышей НГ Сх32

Сравнение моментов времени	Группа воздействия терапевтическим вектором AAV9.Mpz - GJB1	Группа воздействия контрольным вектором AAV9.Mpz - Egfp
-----------------------------------	--	--

(возраст в месяцах)	(тест Манна – Уитни по сравнению с контролем)					
	Ротарод 20 об/мин (с)	Ротарод 32 об/мин (с)	Тест хвата задней конечности (g)	Ротарод 20 об/мин (с)	Ротарод 32 об/мин (с)	Тест хвата задней конечности (g)
6	317,7 ± 45,62; p > 0,05	103,5 ± 27,90; p > 0,05	74,5 ± 5,46; p > 0,05	345,1 ± 85,60	159,7 ± 56,34	76,0 ± 9,14
8	241,3 ± 35,92; p > 0,05	84,6 ± 26,89; p > 0,05	93,5 ± 5,18; p = 0,0196	207,7 ± 38,43	64,5 ± 18,60	76,2 ± 3,41
10	312,7 ± 39,79; p > 0,05	121,9 ± 27,42; p = 0,0427	103,4 ± 6,01; p = 0,0025	288,9 ± 42,44	71,2 ± 25,86	73,2 ± 5,15

Пример 7: исследования проводимости седалищного двигательного нерва

На мышей НГ Сх32 КО воздействовали так, как описано в примере 6 выше, в возрасте 6 месяцев после начала нейропатии, а затем проводили исследования проводимости двигательного нерва так, как описано ниже, у мышей в возрасте 10 месяцев.

Скорость проводимости двигательного нерва (СПДН): СПДН измеряли *in vivo* с использованием опубликованных методов (62) от двусторонних седалищных нервов после стимуляции у анестезированных животных в седалищной вырезе и дистально в области лодыжки с помощью биполярных электродов с супрамаксимальными прямоугольными импульсами (5 В) по 0,05 мс. Периоды латентности вызванного мышечного потенциала действия (ВМПД, англ. «СМАР») регистрировали с помощью биполярного электрода, вставленного между 2-м и 3-м пальцами задней конечности, и измеряли от артефакта стимула до начала отрицательного отклонения М-волны. СПДН рассчитывали путем деления расстояния между стимулирующим и регистрирующим электродами на результат вычитания дистального периода латентного из проксимального.

Результаты исследования СПДН, проведенного у мышей в возрасте 10 месяцев, представлены на фиг. 5 и в таблице 6 ниже, и показывают, что скорость проведения

двигательного нерва улучшилась при измерении через 10 месяцев у мышей НГ Сх32, получавших GJB1, и приблизилась к уровням дикого типа, по сравнению с контрольной группой, получавшей контрольный вектор (n = 10 мышей).

Таблица 6: измерения скорости и амплитуды проводимости двигательных нервов у мышей, получавших AAV9.Mpz.EGFP (контрольный вектор, группа контрольного воздействия НГ Сх32), мышей, получавших AAV9.Mpz.GJB1 (терапевтический вектор, группа терапевтического воздействия) и мышей ДТ

	Контрольный вектор	Терапевтический вектор	р-значение контроля по сравнению с терапией	ДТ	р-значение ДТ по сравнению с терапией
СПДН (м/с)	30,4 ± 0,87	34,8 ± 1,44	0,0316	41,7 ± 1,62	0,0068
Амплитуда	3,2 ± 0,35	4,15 ± 3,22	> 0,05	3,3 ± 0,29	> 0,05
N	10	11		8	

Пример 8: морфологический анализ передних корешков спинного мозга, седалищных нервов и бедренных нервов у мышей НГ Сх32 после интратекальной доставки AAV9 - Mpz.GJB1 по сравнению с мышами, на которых воздействовали контрольным вектором

На мышей НГ Сх32 КО воздействовали так, как описано в примере 6 выше, в возрасте 6 месяцев, и обследовали через 4 месяца в возрасте 10 месяцев.

Мышам выполняли транскардиальную перфузию 2,5% глутаровым альдегидом в 0,1 М ФСБ. Поясничный отдел спинного мозга со множеством прикрепленных корешков, а также бедренные и седалищные нервы препарировали и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C, затем осмифицировали, дегидрировали заливали аралдитовой смолой (все

указанные реактивы приобретены у Agar Scientific, Эссекс, Великобритания). Получали поперечные полутонкие срезы (1 мкм) поясничного отдела спинного мозга с корешками, средней части бедренного двигательного нерва и средней части седалищного двигательного нерва, и окрашивали их щелочным толуидиновым синим (Sigma-Aldrich, г. Мюнхен, Германия). Срезы визуализировали с помощью объективов 10×, 20× и 40×, и регистрировали камерой Nikon DS-L3 (Nikon Eclipse-Ni; г. Токио, Япония). Изображения целых корешков или поперечных срезов нервов получали при конечном увеличении 100× – 200×, а серию частично перекрывающихся полей, покрывающих площадь поперечного сечения корешков или нервов, получали при конечном увеличении 400×. Эти изображения использовали для изучения степени аномальной миелинизации в обеих группах так, как описано ранее (22, 32, 63). Кратко, все демиелинизированные, ремиелинизированные и нормально миелинизированные аксоны подсчитывали с использованием следующих критериев: аксоны размером более 1 мкм без миелиновой оболочки считали демиелинизированными, аксоны с миелиновыми оболочками < 10% диаметра аксона и (или) аксоны, окруженные «луковицами» (т. е. расположенными по окружности отростками шванновских клеток и внеклеточным матриксом), считали ремиелинизированными, а другие миелинизированные аксоны считали нормально миелинизированными.

Кроме того, подсчитывали число пенистых макрофагов, присутствующих во всем поперечном сечении каждого корешка или нерва, как признак воспаления. Макрофаги идентифицировали в полутонких срезах при увеличении 400× как клетки, нагруженные миелиновыми остатками, лишенные базальной мембраны и распространяющие небольшие отростки, похожие на микроворсинки, так, как описано ранее (64, 65). Число макрофагов рассчитывали как их соотношение на 1000 миелинизированных волокон, чтобы учесть разницу в размерах между разными спинными корешками и нервами. Все патологические анализы выполняли заслепленным от условий воздействия образом для каждой мыши.

Результаты представлены на фиг. 6 и в таблице 7 (для передних корешков спинного мозга), на фиг. 7 и в таблице 8 (для седалищных нервов), и на фиг. 8 и в таблице 9 (для бедренных двигательных нервов). Эти результаты показывают улучшенную миелинизацию спинномозговых корешков, седалищных нервов и бедренных нервов по сравнению с контрольной группой, получавшей нетерапевтический вектор, с меньшим числом демиелинизированных и ремиелинизированных волокон, а также с улучшенным соотношением аномально миелинизированных волокон. Во всех образцах выявили

уменьшение числа пенистых макрофагов в группе, получавшей GJB1, что указывает на уменьшение воспаления в группе, получавшей терапевтический вектор.

Таблица 7: результаты морфометрического анализа передних поясничных корешков у мышей НГ Сх32, которым интратекально вводили терапевтический вектор, в возрасте 10 месяцев

	Инъекция AAV9 - <i>Mrz.Egfp</i> (контрольный вектор)	Инъекция AAV9 - <i>Mrz.GJB1</i> (терапевтический вектор)	Тест Манна – Уитни
Передние поясничные корешки	(n = 10 мышей)	(n = 10 мышей)	
Соотношение аномально миелинизированных волокон	0,315 ± 0,016	0,215 ± 0,032	p = 0,0147
Число макрофагов на 1000 волокон	14,85 ± 1,38	9,31 ± 1,20	p = 0,0068

Таблица 8: результаты морфометрического анализа седалищных нервов у мышей НГ Сх32, которым интратекально вводили терапевтический вектор, в возрасте 10 месяцев

	Инъекция AAV9 - <i>Mrz.Egfp</i> (контрольный вектор)	Инъекция AAV9 - <i>Mrz.GJB1</i> (терапевтический вектор)	Тест Манна – Уитни
Седалищные нервы	(n = 10 мышей)	(n = 10 мышей)	
Соотношение аномально миелинизированных волокон	0,105 ± 0,004	0,058 ± 0,003	p < 0,0001

Число макрофагов на 1000 волокон	7,76 ± 0,48	3,84 ± 0,69	p = 0,0005
---	-------------	-------------	------------

Таблица 9: результаты морфометрического анализа бедренных двигательных нервов у мышей НГ Сх32, которым интратекально вводили терапевтический вектор, в возрасте 10 месяцев

	Иньекция AAV9 - <i>Mrz.Egfp</i> (контрольный вектор)	Иньекция AAV9 - <i>Mrz.GJB1</i> (терапевтический вектор)	Тест Манна – Уитни
Бедренные нервы	(n = 9 мышей)	(n = 10 мышей)	
Соотношение аномально миелинизированных волокон	0,333 ± 0,012	0,207 ± 0,009	p < 0,0001
Число макрофагов на 1000 волокон	10,03 ± 0,47	4,87 ± 0,73	p < 0,0001

Пример 9: разработка векторов AAV для нацеленной экспрессии в шванновских клетках, управляемой элементами минимального промотора (miniMrz)

Подход на основе AAV9, описанный в приведенных выше примерах, имеет высокий потенциал для внедрения в клиническую практику для лечения других демиелинизирующих типов ШМТ, включая ШМТ4С. Тем не менее, необходимо преодолеть ограничение меньшей емкости трансгена в векторах AAV.

Чтобы облегчить AAV-опосредованную, нацеленную на шванновские клетки экспрессию гена, авторы данного изобретения клонировали минимальную версию промотора Mrz. Начиная с полноразмерного промотора Mrz размером 1127 т. п. о. (SEQ ID NO. 4) и на основании данных энхансера/ChIP-seq, указывающих на то, что функциональные регуляторные элементы (сайты связывания Egr2 и Sox10) полноразмерного промотора Mrz расположены в пределах 400 п. о. в направлении к 5' от стартового кодона (56), авторы

данного изобретения выбрали данную стратегию с целью достижения целевой экспрессии в шванновских клетках с помощью промотора минимального размера, чтобы оставаться в пределах емкости вектора AAV. Авторы данного изобретения амплифицировали с помощью ПЦР участок в 410 п. о. от данного промотора miniMrz в плазмиду для переноса AAV вместе с Egfp, расположенным в направлении к 3', в качестве репортерного гена, и получили вектор AAV9 - miniMrz.Egfp (SEQ ID NO. 3 и фиг. 9).

Данный вектор AAV9 - miniMrz.Egfp также валидировали *in vivo* на мышах дикого типа (ДТ) возрастом 2 месяца с использованием того же метода доставки, который описан в примере 3, с помощью однократной интратекальной инъекции в поясничный отдел, и было показано, что он стимулирует экспрессию репортерного гена EGFP в высоком проценте миелинизирующих шванновских клеток по всей ПНС. Выявили широко распространенную экспрессию данного вектора, которая в основном ограничивалась миелинизирующими шванновскими клетками в тканях ПНС, с коэффициентами экспрессии более 50% и высокими числами копий вектора (ЧКВ) в поясничных корешках спинного мозга и периферических нервах (фиг. 10).

Иммуноокрашивание ткани спинного мозга мышей, которым вводили AAV9 - miniMrz - Egfp, которое проводили аналогично тому, как описано в примере 4, клеточными маркерами, включая нейрональный маркер NeuN, астроцитарный маркер GFAP и олигодендроцитарный маркер CC-1, в белом и сером веществе в сочетании с EGFP показало экспрессию miniMrz-управляемой конструкции лишь в очень небольшом подмножестве, около 2-3%, нейронов и клеток глии в ЦНС, как определено количественно у n = 3 - 5 мышей (фиг. 11).

Результаты показаны на фиг. 10 (поясничный корешок и седалищный нерв) и на фиг. 11 (поясничный отдел спинного мозга), и демонстрируют, что экспрессия EGFP соответствующим образом распределена в поясничном корешке и седалищном нерве, и что в поясничном отделе спинного мозга экспрессия минимальна, показывая, что после инъекции происходят биораспределение данного вектора и экспрессия репортерного белка EGFP в шванновских клетках периферической нервной системы.

Пример 10: эффективность генной терапии при ее осуществлении до начала заболевания на модели ШМТ1Х на ранних стадиях нейропатии

Группам мышей с нокаутом гена (НГ) Сх32 – модели ШМТ1Х – в возрасте 2 месяцев (n = 10 мышей на группу) вводили терапевтический (полный) вектор AAV9 - Mrp - GJB1 или нетерапевтический вектор (отрицательный контроль) AAV9 - Mrp - Egfr. Поведенческий анализ проводился до воздействия, а также в возрасте 4 месяцев и 6 месяцев. Электрофизиологический анализ проводили в возрасте 6 месяцев с последующим морфологическим анализом полутонких срезов периферических нервных тканей. Использовались те же протоколы, что описаны в примерах 6-8 выше, с тем отличием, что на мышей воздействовали в возрасте 2 месяцев.

Эти данные представляют собой модель для лечения мышей на ранних стадиях нейропатии (возраст 2 месяца) до начала заболевания в дополнение к лечению после начала заболевания на более поздней стадии в 6 месяцев (примеры 6-8).

Результат поведенческого исследования у мышей НГ Сх32 возрастом 6 месяцев, получавших терапевтический вектор, по сравнению с воздействием контрольным вектором. Группам мышей с нокаутом гена (НГ) Сх32 – модели ШМТ1Х – в возрасте 2 месяцев вводили либо указанный терапевтический (полный) вектор, либо указанный нетерапевтический вектор (отрицательный контроль), и у данных мышей исследовали двигательные способности в возрасте 4 месяцев и 6 месяцев. Группа, получавшая терапевтический вектор, показала значительно улучшенную мышечную силу в оба момента времени по сравнению с группой, получавшей контрольный вектор (фиг. 12А и фиг. 12В). Группа, получавшая терапевтический вектор, также показала значительное улучшение с течением времени после воздействия указанным вектором (фиг. 12С), тогда как мыши, получавшие контрольный вектор, не показали никакого улучшения.

Электрофизиологические исследования у мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших до начала заболевания терапевтический вектор, по сравнению с воздействием контрольным вектором

Электрофизиологические исследования у мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших терапевтический (полный) вектор или контрольный вектор, показали значительное улучшение скорости проводимости седалищного нерва после воздействия генной терапией, как показано на фиг. 13.

На фиг. 13 показано значительно улучшенные скорости проводимости седалищного нерва у мышей НГ Сх32 КО, получавших до начала заболевания AAV9 - Mrz - GJB1 (полный вектор), по сравнению с воздействием контрольным вектором.

Морфологические исследования у мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших терапевтический вектор, по сравнению с воздействием контрольным вектором

Морфологические исследования у мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших терапевтический вектор, по сравнению с воздействием контрольным вектором. Исследовали полутонкие срезы передних поясничных корешков (фиг. 14), средне-седалищных нервов (фиг. 15) и бедренных двигательных нервов (фиг. 16), и количественно определяли долю аномально миелинизированных волокон, а также число макрофагов, в группах мышей НГ Сх32 в возрасте 6 месяцев, получавших терапевтический вектор, по сравнению с воздействием контрольным вектором.

Как показано на каждой из фиг. 14, фиг. 15 и фиг. 16, у мышей, получавших терапевтический вектор, было обнаружено меньшее число демиелинизированных (*) или ремиелинизированных (†) волокон и меньшее число пенистых макрофагов по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор. Это свидетельствует об улучшенной миелинизации и уменьшении воспаления в группе, получавшей терапевтический вектор.

Пример 11: разработка гуманизированного терапевтического вектора для лечения ШМТ1Х

Векторы, описанные в примере 1, контролируются промотором Mrz крысы. Чтобы гуманизировать данную конструкцию и сделать ее более подходящей для клинического применения, авторы данного изобретения также клонировали конструкцию Mrz - GJB1 человека (SEQ ID NO: 17) с использованием промотора hP0 человека (SEQ ID NO: 18), который можно использовать для доклинических испытаний зависимости ответа от дозы и для исследований токсичности и биораспределения у нечеловекообразных приматов (НЧП, англ. «NHP»). Последовательность P0 человека амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК с использованием праймеров для введения рестрикционных ферментов KpnI и AgeI. Указанные праймеры представляют собой: KpnhP0 - F - 5'-AGGGGTACCGCCTGGCATAAAC-3' (SEQ ID NO. 25) и AgehP0 - R - 5' - AATTTACCGGTGCTGGGGCAG-3' (SEQ ID NO. 26). После лигирования hP0 вырезали OРС Сх32 из ранее существовавшей конструкции с использованием BamHI и XhoI. Сх32 лигировали в конструкцию для переноса AAV, а правильность сборки экспрессионной

кассеты подтверждали с помощью картирования рестрикционным расщеплением и прямого секвенирования.

Также получали плазмиду гуманизованного контрольного вектора (Mrz человека - Egfp) для применения в качестве контроля (SEQ ID NO: 19).

Пример 12: разработка и анализ экспрессии терапевтического вектора для лечения ШМТ4С

Конструкцию mini-Mrz-SH3TC2.myc, аналогичную той, которая описана в примере 9, в которой используется промотор mini-Mrz крысы с SEQ ID NO. 5, разрабатывали с использованием вставки гена SH3TC2 и с дальнейшими модификациями в сегменте ИКП-ИКП(включая удаление WPRE и замену полиА минимальным синтетическим полиА) (68, 69), чтобы оставаться в пределах около 4700 п. о. для эффективной упаковки в AAV9. Последовательность указанного терапевтического вектора представлена в SEQ ID NO: 20.

Анализ экспрессии указанного нового терапевтического вектора (mini-Mrz - SH3TC2.myc) проводили в группах мышей модели ШМТ4С. Данные результаты дополняют разработку минимального промоторного вектора Mrz, управляющего экспрессией репортерного гена, описанного в примере 9 выше.

Получили новую конструкцию, AAV - miniMrz - SH3TC2.myc, упакованную в серотип AAV9, и достигли концентрации в 5×10^{12} вг/мл. Указанный вектор (в общей сложности 1×10^{11} вг в объеме 20 мкл) вводили с помощью интратекальной инъекции в поясничный отдел мышам Sh3tc2-/- (n = 5) в возрасте 5 месяцев и исследовали экспрессию через 5 недель после инъекции в фиксированных срезах поясничного спинномозгового корешка и билатерального седалищного нерва.

Высокий уровень экспрессии SH3TC2 обнаружили в большом проценте миелинизирующих шванновских клеток по всей ПНС, включая корешки и седалищные нервы, в характерном перинуклеарном зернистом виде, а иногда и по всей длине шванновских клеток (фиг. 17A-F). Количественная оценка процента SH3TC2-иммунореактивных шванновских клеток выявила средний уровень экспрессии 54,67% в поясничных корешках и 45,39% в седалищных нервах (фиг. 17G).

Данные результаты показывают, что конструкция достигла хорошего уровня экспрессии в миелинизирующих шванновских клетках по всей ПНС.

Пример 13: разработка гуманизованного терапевтического вектора для лечения ШМТ4С

Конструкцию mini - Mrp - SH3TC2.myc (SEQ ID NO: 20) (описана в примере 12 выше), которая хорошо подходит для доклинических испытаний (благодаря включению минимальной версии промотора Mrp крысы и метки myc на SH3TC2 для облегчения доклинического анализа экспрессии) изменяли с тем, чтобы сделать ее более подходящей для клинического применения (SEQ ID NO: 21).

Метку myc удаляли, а минимальную версию промотора крысы заменяли соответствующей последовательностью минимального промотора Mrp человека (SEQ ID NO: 22). Данный вектор можно использовать для окончательного доклинического исследования зависимости ответа от дозы и для исследований токсичности и биораспределения у НЧП перед тем, как перейти к клиническим применениям. Также получали плазмиду гуманизованного контрольного вектора (miniMrp человека - E GFP) (SEQ ID NO: 23).

Список литературы

1. Baets J, De Jonghe P, Timmerman V. Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol*. 2014; 27 (5): 532 - 40.
2. Kleopa KA, Scherer SS. Inherited Neuropathies. *Neurol Clinics North America*. 2002; 20: 679 - 709.
3. Kleopa KA, Kagiava A, Sargiannidou I. Gene Therapy for CMT Inherited Neuropathy. В: Duan D, Mendell J (eds): *Muscle Gene Therapy*. 2019; https://doi.org/10.1007/978-3-030-03095-7_35 (Springer, Cham).
4. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Oronzi-Scott M, Bone L, Paul DL, et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*. 1993; 262: 2039 - 42.
5. Kleopa KA, Scherer SS. Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006; 8: 107 - 22.
6. Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ, Feasby TE. X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain*. 1990; 113: 1511 - 25.
7. Birouk N, Le Guern E, Maisonobe T, Rouger H, Gouider R, Gugenheim M, et al. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations - clinical and electrophysiological study. *Neurology*. 1998; 50: 1074 - 82.
8. Shy ME, Siskind C, Swan ER, Krajewski KM, Doherty T, Fuerst DR, et al. CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. *Neurology*. 2007; 68: 849 - 55.

9. Dubourg O, Tardieu S, Birouk N, Gouider R, Léger JM, Maissonobe T, et al. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot–Marie–Tooth disease. *Brain*. 2001; 124: 1958 - 67.
10. Liang GSL, de Miguel M, Gomez-Hernandez JM, Glass JD, Scherer SS, Mintz M, et al. Severe neuropathy with leaky connexin32 hemichannels. *Ann Neurol*. 2005; 57: 749 - 54.
11. Al-Mateen M, Craig AK, Chance PF. The Central Nervous System Phenotype of X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease: A Transient Disorder of Children and Young Adults. *J Child Neurol*. 2014; 29: 342 - 8.
12. Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, Bilbao JM, Vallat J-M. Pathological findings in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis. *Acta Neuropathol*. 2001; 101: 129 - 39.
13. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain*. 2003; 126: 134 - 51.
14. Kleopa KA, Zamba-Papanicolaou E, Alevra X, Nicolaou P, Georgiou D-M, Hadjisavvas A, et al. Phenotypic and cellular expression of two novel connexin32 mutations causing CMT1X. *Neurology*. 2006; 66: 396 - 402.
15. Omori Y, Mesnil M, Yamasaki H. Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol Biol Cell*. 1996; 7 (6): 907 - 16.
16. Yoshimura T, Satake M, Ohnishi A, Tsutsumi Y, Fujikura Y. Mutations of connexin32 in Charcot-Marie-Tooth disease type X interfere with cell-to-cell communication but not cell proliferation and myelin-specific gene expression. *J Neurosci Res*. 1998; 51 (2): 154 - 61.
17. Yum SW, Kleopa KA, Shumas S, Scherer SS. Diverse trafficking abnormalities of Connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol Dis*. 2002; 11: 43 - 52.
18. Deschênes SM, Walcott JL, Wexler TL, Scherer SS, Fischbeck KH. Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci*. 1997; 17: 9077 - 84.
19. Oh S, Ri Y, Bennett MVL, Trexler EB, Verselis VK, Bargiello TA. Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 1997; 19 (4): 927 - 38.
20. Martin PEM, Mambetisaeva ET, Archer DA, George CH, Evans WH. Analysis of gap junctions assembly using mutated connexins detected in Charcot-Marie-Tooth X-linked disease. *J Neurochem*. 2000; 74: 711 - 20.

21. Kleopa KA, Yum SW, Scherer SS. Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. *J Neurosci Res.* 2002; 68: 522 - 34.
22. Sargiannidou I, Vavlitou N, Aristodemou S, Hadjisavvas A, Kyriacou K, Scherer SS, et al. Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects. *J Neurosci.* 2009; 29: 4748 - 61.
23. Sargiannidou I, Kim GH, Kyriakoudi S, Eun BL, Kleopa KA. A start codon CMT1X mutation associated with transient encephalomyelitis causes complete loss of Cx32. *Neurogenetics.* 2015; 16 (3): 193 - 200.
24. Anzini P, Neuberg DH-H, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, et al. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin32. *J Neurosci.* 1997; 17: 4545 - 61.
25. Scherer SS, Xu Y-T, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ. Connexin32-null mice develop a demyelinating peripheral neuropathy. *Glia.* 1998; 24: 8 - 20.
26. Scherer SS, Xu YT, Messing A, Willecke K, Fischbeck KH, Jeng LJ. Transgenic expression of human connexin32 in myelinating Schwann cells prevents demyelination in connexin32-null mice. *J Neurosci.* 2005; 25: 1550 - 9.
27. Abel A, Bone LJ, Messing A, Scherer SS, Fischbeck KF. Studies in transgenic mice indicate a loss of connexin32 function in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58: 702 - 10.
28. Jeng LJ, Balice-Gordon RJ, Messing A, Fischbeck KH, Scherer SS. The effects of a dominant connexin32 mutant in myelinating Schwann cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 32: 283 - 98.
29. Kagiava A, Karaiskos C, Richter J, Tryfonos C, Lapathitis G, Sargiannidou I, et al. Intrathecal gene therapy in mouse models expressing CMT1X mutations. *Hum Mol Genet.* 2018; 27 (8): 1460 - 73.
30. Huang Y, Sirkowski EE, Stickney JT, Scherer SS. Prenylation-defective human connexin32 mutants are normally localized and function equivalently to wild-type connexin32 in myelinating Schwann cells. *J Neurosci.* 2005; 25: 7111 - 20.
31. Hahn AF, Ainsworth PJ, Naus CCG, Mao J, Bolton CF. Clinical and pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle Nerve.* 2000: S39 - S48.
32. Sargiannidou I, Kagiava A, Bashiardes S, Richter J, Christodoulou C, Scherer SS, et al. Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of CMT1X. *Ann Neurol.* 2015; 78: 303 - 16.

33. Kagiava A, Sargiannidou I, Theophilidis G, Karaiskos C, Richter J, Bashiardes S, et al. Intrathecal gene therapy rescues a model of demyelinating peripheral neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (17): E2421 - 9. doi: 10.1073/pnas.1522202113.
34. Kyriakoudi S, Sargiannidou I, Kagiava A, Olympiou M, Kleopa KA. Golgi-retained Cx32 mutants interfere with gene addition therapy for CMT1X. *Hum Mol Genet*. 2017; 26 (9): 1622 - 33.
35. Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015; 86 (8): 873 - 8.
36. Kessali M, Zemmouri R, Guilbot A, Maisonobe T, Brice A, LeGuern E, et al. A clinical, electrophysiologic, neuropathologic, and genetic study of two large Algerian families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 1997; 48 (4): 867 - 73.
37. Gabreels-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, LeGuern E, Gabreels F, van Engelen B, et al. Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66 (5): 569 - 74.
38. Azzedine H, Ravise N, Verny C, Gabreels-Festen A, Lammens M, Grid D, et al. Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology*. 2006; 67 (4): 602 - 6.
39. Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, et al. A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet*. 2005; 42 (12): e69.
40. Colomer J, Gooding R, Angelicheva D, King RH, Guillen-Navarro E, Parman Y, et al. Clinical spectrum of CMT4C disease in patients homozygous for the p.Arg1109X mutation in SH3TC2. *Neuromuscul Disord*. 2006; 16 (7): 449 - 53.
41. Varley TL, Bourque PR, Baker SK. Phenotypic variability of CMT4C in a French-Canadian kindred. *Muscle Nerve*. 2015.
42. Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, et al. Mutations in a Gene Encoding a Novel SH3/TPR Domain Protein Cause Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Type 4C Neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2003; 73: 1106 - 19.
43. LeGuern E, Guilbot A, Kessali M, Ravise N, Tassin J, Maisonobe T, et al. Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33. *Hum Mol Genet*. 1996; 5 (10): 1685 - 8.

44. Lassuthova P, Mazanec R, Vondracek P, Siskova D, Haberlova J, Sabova J, et al. High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clin Genet*. 2011; 80 (4): 334 - 45.
45. Lupo V, Galindo MI, Martinez-Rubio D, Sevilla T, Vilchez JJ, Palau F, et al. Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet*. 2009; 18 (23): 4603 - 14.
46. Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles AS, Stendel C, Roos A, Medard JJ, et al. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (41): 17528 - 33.
47. Gouttenoire EA, Lupo V, Calpena E, Bartesaghi L, Schupfer F, Medard JJ, et al. Sh3tc2 deficiency affects neuregulin-1/ErbB signaling. *Glia*. 2013; 61 (7): 1041 - 51.
48. Zoupi L, Savvaki M, Karageorgos D. Axons and myelinating glia: An intimate contact. *IUBMB Life*. 2011; 63 (9): 730 - 5.
49. Schiza N, Georgiou E, Kagiava A, Médard J-J, Richter J, Tryfonos C, et al. Gene replacement therapy in a model of Charcot-Marie-Tooth 4C neuropathy. *Brain*. 2019; 142 (5): 1227 - 1241.
50. Tanguy Y, Biferi MG, Besse A, Astord S, Cohen-Tannoudji M, Marais T, et al. Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front Mol Neurosci*. 2015; 8: 36.
51. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*. 2009; 27 (1): 59 - 65.
52. Gurda BL, De Guilhem De Lataillade A, Bell P, Zhu Y, Yu H, Wang P, et al. Evaluation of AAV-mediated Gene Therapy for Central Nervous System Disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII. *Mol Ther*. 2016; 24 (2): 206 - 16.
53. Calcedo R, Wilson JM. Humoral Immune Response to AAV. *Front Immunol*. 2013; 4: 341.
54. Jackson KL, Dayton RD, Klein RL. AAV9 supports wide-scale transduction of the CNS and TDP-43 disease modeling in adult rats. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2015; 2: 15036.
55. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, McGovern V, Likhite S, et al. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol Ther*. 2015; 23 (3): 477 - 87.
56. Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem*. 2009; 284 (30): 20111 - 20.

57. von Jonquieres G, Mersmann N, Klugmann CB, Harasta AE, Lutz B, Teahan O, et al. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65646.
58. Georgiou E, Sidiropoulou K, Richter J, Papaneophytou C, Sargiannidou I, Kagiava A, et al. Gene therapy targeting oligodendrocytes provides therapeutic benefit in a leukodystrophy model. *Brain*. 2017; 140 (3): 599 - 616.
59. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther*. 1999; 6 (6): 973 - 85.
60. Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, Penalva C, Monfar M, Chillon M. Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther Methods*. 2015; 26 (1): 35 - 42.
61. Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, Sargiannidou I, Karatzioula P, Watanabe K, et al. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol Cell Neurosci*. 2008; 39: 478 - 90.
62. Zielasek J, Martini R, Toyka KV. Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve*. 1996; 19 (8): 946 - 52.
63. Vavlitou N, Sargiannidou I, Markoullis K, Kyriacou K, Scherer SS, Kleopa KA. Axonal pathology precedes demyelination in a mouse model of X-linked demyelinating/type I Charcot-Marie Tooth neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69: 945 - 58.
64. Kobsar I, Berghoff M, Samsam M, Wessig C, Maurer M, Toyka KV, et al. Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain*. 2003; 126: 804 - 13.
65. Groh J, Heidl K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, et al. Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 3530 - 43.
66. Shevtsova, Z., et al. (2005). Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp Physiol*; 90 (1): 53 - 59.
67. von Jonquieres, G., et al. (2016). Recombinant Human Myelin-Associated Glycoprotein Promoter Drives Selective AAV-Mediated Transgene Expression in Oligodendrocytes. *Front Mol Neurosci*; 9: 13.
68. Levitt, N., Briggs, D., Gil, A., and Proudfoot, N.J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev*. 3, 1019 - 1025.

69. Bailey RM, Armao D, Nagabhushan Kalburgi S, Gray SJ. Development of Intrathecal AAV9 Gene Therapy for Giant Axonal Neuropathy. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Feb 15; 9: 160 - 171.

Далее варианты осуществления данного изобретения будут описаны в следующих пронумерованных пунктах.

1. Вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, и при этом указанный вирусный вектор представляет собой вектор AAV.

2. Вирусный вектор для применения по п. 1, отличающийся тем, что экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем промотора, специфичного в отношении шванновских клеток, необязательно – промотора, специфичного в отношении миелина.

3. Вирусный вектор для применения по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем полноразмерного промотора миелинового белка ноль (Mpz), при этом указанный полноразмерный промотор представляет собой полноразмерный промотор миелинового белка ноль крысы или человека.

4. Вирусный вектор для применения по пп. 1-3, отличающийся тем, что экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем промотора, длина которого составляет от 100 п. о. до 1100 п. о., необязательно при этом длина указанного промотора составляет от 200 п. о. до 900 п. о., от 300 п. о. до 800 п. о., от 400 п. о. до 700 п. о., необязательно при этом длина указанного промотора составляет от 500 п. о. до 600 п. о., необязательно при этом длина указанного промотора составляет 410 п. о.

5. Вирусный вектор для применения по п. 4, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой полноразмерный или минимальный промотор, необязательно – минимальный промотор миелинового белка ноль (Mpz), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%

гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.

6. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный вектор обладает способностью трансдуцировать шванновские клетки.

7. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный вектор не интегрируется в геном клетки-хозяина.

8. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный вектор AAV выбран из группы, включающей в себя: AAV9 и AAVrh10.

9. Вирусный вектор для применения по п. 8, отличающийся тем, что указанный вектор AAV представляет собой AAV9.

10. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный первый полинуклеотид кодирует и транслируется в первый полипептид или белок.

11. Вирусный вектор для применения по п. 10, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота содержит:

а) последовательность дикого типа или терапевтически полезную последовательность гена, ассоциированного с нейропатией, необязательно выбранного из группы, содержащей или состоящей из любого из следующих генов: ген белка щелевого контакта бета 1 (GJB1); ген белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); ген периферического миелинового белка 22 (PMP22); ген миелинового белка ноль (MPZ); ген белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); ген белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); ген белка 1, регулируемого N-Мус ниже по

каскаду (NDRG1), или другие гены, ассоциированные с демиелинизирующей нейропатией и дисфункцией шванновских клеток; или

b) последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности дикого типа гена, ассоциированного с нейропатией, например, последовательности одного из следующих генов: гена белка щелевого контакта бета 1 (GJB1); гена белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); гена периферического миелинового белка 22 (PMP22); гена миелинового белка ноль (MPZ); гена белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); гена белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); гена белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1), или других генов, ассоциированных с демиелинизирующей нейропатией и дисфункцией шванновских клеток;

необязательно при этом указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательностям с SEQ ID NO. 6-12, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательностям с SEQ ID NO. 6-12.

12. Вирусный вектор для применения по п. 10 или п. 11, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота содержит форму открытой рамки считывания (ОРС) дикого типа или кДНК, которая транскрибируется в первый полинуклеотид, кодирующий один или большее число полипептидов, необязательно – выбранных из группы, содержащей или состоящей из следующих белков: коннексин-32 (Cx32); белок 2, содержащий домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); периферический миелиновый белок 22 (PMP22); миелиновый белок ноль (MPZ); белок 2 раннего ростового ответа (EGR2); белок 1, ассоциированный с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); белок 1, регулируемый N-Мус ниже по каскаду (NDRG1).

13. Вирусный вектор для применения по пп. 10-11, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота содержит открытую рамку считывания (ОРС) гена дикого типа белка щелевого контакта бета 1 (GJB1).
14. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный вектор способен управлять экспрессией из указанного первого полинуклеотида, необязательно – управлять экспрессией первого полипептида, необязательно при этом указанный первый полипептид представляет собой белок коннексин 32 (Cx32), необязательно – Cx32 дикого типа.
15. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный первый полинуклеотид кодирует один или большее число из следующего: трофический фактор (например, НФГМ, НФГК, НТ-3, ФРЭС), регенеративный фактор (например, ангиогенин, Oct-6, Egr2, Sox-10), фактор роста (например, ИФР).
16. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что введение указанного вирусного вектора приводит к экспрессии первого белка из первого полинуклеотида, что приводит к улучшенному функционированию шванновских клеток и (или) повышенному образованию миелиновой оболочки.
17. Вирусный вектор для применения по пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный первый полинуклеотид не кодирует полипептид, необязательно при этом указанный первый полинуклеотид представляет собой некодирующую РНК.
18. Вирусный вектор для применения по п. 17, отличающийся тем, что указанная некодирующая РНК представляет собой короткую шпилечную РНК (кшРНК); микро-РНК (микроРНК); гидовую РНК (гРНК).
19. Вирусный вектор для применения по любому из п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что когда указанный вирусный вектор находится в целевом организме, тогда экспрессия указанной некодирующей РНК вызывает снижение экспрессии целевого полинуклеотида, при этом указанный целевой полинуклеотид необязательно представляет собой ген, расположенный в целевом организме, необязательно – расположенный в клетке целевого организма.

20. Вирусный вектор для применения по п. 19, отличающийся тем, что экспрессия или сверхэкспрессия указанного целевого полинуклеотида в целевом организме рассматривается как ассоциированная с заболеванием, связанным со шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой доминантную демиелинизирующую нейропатию (ШМТ1), необязательно при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой мутированную аллель миелинового белка ноль (Mrz/P0) и указанное заболевание, связанное со шванновскими клетками, представляет собой ШМТ1В, или при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой другой доминантный ген, ассоциированный с ШМТ1.

21. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 17-20, отличающийся тем, что введение указанного вирусного вектора приводит к улучшенному функционированию шванновских клеток и (или) повышенному образованию миелиновой оболочки.

22. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что заболевание, связанное со шванновскими клетками, вызывает разрушение и (или) снижение образования миелиновой оболочки шванновскими клетками.

23. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из следующего: болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ); наследственная компрессионная нейропатия (НКН); диабетические и другие токсические периферические нейропатии; болезнь двигательных нейронов (БДН).

24. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ).

25. Вирусный вектор для применения по п. 24, отличающийся тем, что указанное заболевание выбрано из следующего: болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1Х (ШМТ1Х); болезнь Шарко – Мари – Тута типов 1А-1F (ШМТ1А-1F); болезнь Шарко – Мари – Тута типов 4А-4Н (ШМТ4А-4Н).

26. Вирусный вектор для применения по п. 25, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1Х (ШМТ1Х).
27. Вирусный вектор для применения по п. 25, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 4С (ШМТ4С).
28. Вирусный вектор для применения по п. 16 или п. 21, отличающийся тем, что указанная улучшенная функция является результатом повышенного образования миелиновой оболочки шванновскими клетками по сравнению с образованием миелиновой оболочки шванновскими клетками у данного субъекта до лечения.
29. Вирусный вектор для применения по п. 28, отличающийся тем, что указанное повышенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками приводит к улучшению любого одного или большего числа из следующих параметров:
- а) мышечной силы;
 - б) скорости проведения в седалищном нерве; и (или)
 - с) ответа биомаркеров крови,
- по сравнению с данным субъектом до лечения.
30. Вирусный вектор для применения по п. 28 или п. 29, отличающийся тем, что указанное улучшенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками приводит к улучшенной миелинизации периферических нервов.
31. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный AAV вводят субъекту с помощью интратекальной инъекции или внутривенной инъекции, предпочтительно отличающийся тем, что указанный AAV вводят с помощью интратекальной инъекции.
32. Вирусный вектор для применения по п. 31, отличающийся тем, что указанный AAV вводят с помощью одного из следующих способов: интратекальная инъекция в поясничный отдел; интратекальная инъекция в грудной отдел; интратекальная инъекция в шейный отдел.
33. Вирусный вектор для применения по п. 32, отличающийся тем, что указанный вирусный вектор вводят с помощью интратекальной инъекции в поясничный отдел.

34. Вирусный вектор для применения по пп. 31-33, отличающийся тем, что указанный AAV вводят с помощью однократной интратекальной инъекции.
35. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный субъект, нуждающийся в этом, представляет собой человека.
36. Вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов.
37. Клетка, трансдуцированная вирусным вектором, как определено в любом из предшествующих пунктов, необязательно при этом указанная клетка представляет собой шванновскую клетку.
38. Минимальный специфичный в отношении миелина промотор, при этом указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.
39. Минимальный специфичный в отношении миелина промотор, содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.
40. Полинуклеотидная конструкция, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая представляет собой специфичный в отношении шванновских клеток промотор, необязательно – специфичный в отношении миелина промотор, необязательно содержащая промотор миелинового белка ноль (Mrz) или минимальный специфичный в отношении миелина промотор, как определено в п. 38 или п. 39, функционально связанный со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, при этом указанная вторая нуклеиновая кислота транскрибируется в первый полинуклеотид, и при этом указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты: а) представляет собой открытую рамку считывания или кДНК, или другие элементы гена; или б) транскрибируется в некодирующую РНК.

41. Вирусный вектор, содержащий минимальный специфичный в отношении миелина промотор по любому из п. 38 или п. 39, или полинуклеотидную конструкцию по п. 40.
42. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-35 или вирусный вектор по п. 36 или п. 41, отличающийся тем, что указанный вектор обладает способностью трансдуцировать шванновские клетки.
43. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный вектор не интегрируется в геном клетки-хозяина.
44. Вирусный вектор по любому из п. 42 или п. 43, содержащий:
- a) AAV, необязательно при этом указанный AAV представляет собой AAV9;
 - b) вектор AAV - Mrz.Egfp, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mrz) и репортерный ген EGFP;
 - c) вектор AAV9 - Mrz - GJB1, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mrz) и открытую рамку считывания (OPC) гена щелевого контакта бета 1 (GJB1);
 - d) вектор AAV9 - miniMrz.Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMrz) и репортерный ген EGFP;
 - e) вектор AAV9 - Mrz человека - GJB1, содержащий вектор AAV9, полноразмерный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена щелевого контакта бета 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 17);
 - f) вектор AAV9 - Mrz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, полноразмерный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 19);
 - g) вектор AAV9 - miniMrz - SH3TC2.мус.ITR, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль крысы (Mrz) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 20);
 - h) вектор AAV9 - miniMrz человека - SH3TC2, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 21); или

i) вектор AAV9 - miniMpz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 23).

45. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор по любому из предшествующих пунктов.

46. Фармацевтическая композиция по п. 45, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит соответствующее количество указанного вирусного вектора и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и (или) эксципиент.

45. Применение вирусного вектора по любому из предшествующих пунктов в способе производства медицинского препарата для лечения или профилактики заболевания, связанного со шванновскими клетками, при этом указанное заболевание необязательно вызывает разрушение и (или) снижение образования миелиновой оболочки шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута.

46. Вирусный вектор или полинуклеотидная конструкция по любому из предшествующих пунктов для применения в системе CRISPR/Cas9, при этом указанный вирусный вектор или полинуклеотид включает в себя любой один или большее число из следующего:

a) полинуклеотид, кодирующий единую гидовую РНК (егРНК), нацеленную на представляющий интерес ген;

b) полинуклеотид, кодирующий полипептид Cas9;

c) полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид.

47. Вирусный вектор по любому из предшествующих пунктов для применения в способе мечения шванновских клеток, например, мечения флуоресцентным белком, например, зеленым флуоресцентным белком (GFP) или усиленным зеленым флуоресцентным белком (EGFP), или другим нефлуоресцентным репортером, необязательно при этом указанное мечение шванновских клеток может применяться в способе диагностики заболевания, связанного со шванновскими клетками.

48. Вирусный вектор по любому из пп. 1-43 для применения в способе, при котором шванновские клетки индуцируют к дифференцировке в клетки альтернативного типа (например, в олигодендроциты, астроциты или нейроны).

49. Вирусный вектор по любому из пп. 1-43 для применения в способе стимуляции шванновских клеток для поддержания регенерации у субъекта, нуждающегося в этом, необязательно – после повреждения или травмы.

50. Набор для применения в профилактике или лечении заболевания, связанного со шванновскими клетками, мечения шванновских клеток или регенерации шванновских клеток, при этом указанный набор содержит один или большее число из следующего:

- a) вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов;
- b) полинуклеотидную конструкцию, как определено в п. 40;
- c) вирусный вектор;
- d) вирусный вектор, содержащий полинуклеотидную конструкцию, как определено в п. 40;
- e) фармацевтически приемлемый носитель и (или) эксципиент;
- f) одноразовый шприц, например, одноразовый шприц, подходящий для интратекальной инъекции в поясничный отдел;
- g) инструкцию по применению.

51. Набор по п. 50, отличающийся тем, что указанный набор содержит больше чем один вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов, необязательно при этом указанный набор содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных вирусных векторов, как определено в любом из предшествующих пунктов.

52. Вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, и при этом экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем минимального специфичного в отношении миелина промотора, который необязательно содержит или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 5 или в SEQ ID NO. 22, необязательно при этом указанный вирусный вектор представляет собой вектор AAV.

Следует понимать, что различные изменения и модификации, описанных в данном документе предпочтительных вариантов осуществления данного изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации могут быть выполнены без отступления от сущности и объема данного изобретения и без уменьшения его предлагаемых преимуществ. Поэтому такие изменения и модификации охватываются нижеследующей формулой данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, и при этом указанный вирусный вектор представляет собой вектор AAV.

2. Вирусный вектор для применения по п. 1, отличающийся тем, что экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем специфического в отношении шванновских клеток промотора, необязательно – специфического в отношении миелина промотора, необязательно при этом указанный специфичный в отношении миелина промотор представляет собой:

а) полноразмерный промотор миелинового белка ноль (Mrz), необязательно при этом указанный полноразмерный промотор Mrz представляет собой полноразмерный промотор Mrz крысы или полноразмерный промотор Mrz человека,

необязательно, при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18; или

б) минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMrz), необязательно при этом указанный минимальный промотор Mrz представляет собой минимальный промотор Mrz крысы или минимальный промотор Mrz человека, необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.

3. Вирусный вектор для применения по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем промотора, который:

а) имеет длину от 100 п. о. до 1100 п. о., необязательно при этом указанный промотор имеет длину, которая составляет от 200 п. о. до 900 п. о., от 300 п. о. до 800 п. о., от 400 п. о. до 700 п. о., необязательно при этом указанный промотор имеет длину, которая составляет от 500 п. о. до 600 п. о., необязательно при этом указанный промотор имеет длину 410 п. о.; и (или)

б) имеет длину меньше чем 1100 п. о., 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 450 п. о., 400 п. о., 350 п. о., 300 п. о., 250 п. о., 200 п. о., 150 п. о., 100 п. о.

4. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный вектор AAV выбран из группы, включающей в себя: AAV9 и AAVrh10, предпочтительно отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой AAV9.

5. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует и транслируется в первый полипептид или белок.

6. Вирусный вектор для применения по п. 5, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота содержит:

а) последовательность дикого типа или терапевтически полезную последовательность гена, ассоциированного с нейропатией, необязательно выбранного из группы, содержащей или состоящей из любого из следующих генов: гена белка щелевого контакта бета 1 (GJB1); гена белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); гена периферического миелинового белка 22 (PMP22); гена миелинового белка ноль (MPZ); гена белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); гена белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); гена белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1); или других генов, ассоциированных с демиелинизирующей нейропатией и дисфункцией шванновских клеток; или

б) последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности дикого типа

гена, ассоциированного с нейропатией, например, последовательности одного из следующих генов: гена белка щелевого контакта бета 1 (GJB1); гена белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); гена периферического миелинового белка 22 (PMP22); гена миелинового белка ноль (MPZ); гена белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); гена белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); гена белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1), или других генов, ассоциированных с демиелинизирующей нейропатией и дисфункцией шванновских клеток;

необязательно при этом указанная первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательностям с SEQ ID NO. 6-12, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательностям с SEQ ID NO. 6-12.

7. Вирусный вектор для применения по п. 5 или п. 6, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота содержит форму открытой рамки считывания (ОРС) дикого типа или кДНК, которая транскрибируется в первый полинуклеотид, кодирующий один или большее число полипептидов, необязательно – выбранных из группы, содержащей или состоящей из: коннексина-32 (Cx32); белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); периферического миелинового белка 22 (PMP22); миелинового белка ноль (MPZ); белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1).

8. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный вектор способен управлять экспрессией первой нуклеиновой кислоты, необязательно – управлять экспрессией первого полипептида, необязательно при этом указанный первый полипептид выбран из группы, содержащей или состоящей из: коннексина-32 (Cx32); белка 2, содержащего домены SH3 и тетратрикопептидные повторы (SH3TC2); периферического миелинового белка 22 (PMP22); миелинового белка ноль (MPZ); белка 2 раннего ростового ответа (EGR2); белка 1, ассоциированного с индуцированной ганглиозидом дифференцировкой (GDAP1); белка 1, регулируемого N-Мус ниже по каскаду (NDRG1).

9. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует один или большее число из следующего:

трофический фактор (например, НФГМ, НФГК, НТ-3, ФРЭС), регенеративный фактор (например, ангиогенин, Oct-6, Egr2, Sox-10), фактор роста (например, ИФР).

10. Вирусный вектор для применения по пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота не кодирует полипептид, необязательно при этом указанный первый полинуклеотид представляет собой неcodирующую РНК, необязательно при этом:

указанная неcodирующая РНК представляет собой короткую шпилечную РНК (кшРНК); микро-РНК (микроРНК); гидовую РНК (гРНК).

11. Вирусный вектор для применения по п. 10, отличающийся тем, что когда указанный вирусный вектор находится в целевом организме, тогда экспрессия указанной неcodирующей РНК вызывает снижение экспрессии целевого полинуклеотида, необязательно при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой ген, расположенный в целевом организме, необязательно – расположенный в клетке целевого организма.

12. Вирусный вектор для применения по п. 11, отличающийся тем, что экспрессия или сверхэкспрессия указанного целевого полинуклеотида в целевом организме рассматривается как ассоциированная с заболеванием, связанным со шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой доминантную демиелинизирующую нейропатию (ШМТ1), необязательно при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой мутированную аллель миелинового белка ноль (Mpz/P0) и указанное заболевание, связанное со шванновскими клетками, представляет собой ШМТ1В, или при этом указанный целевой полинуклеотид представляет собой другой доминантный ген, ассоциированный с ШМТ1.

13. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что заболевание, связанное со шванновскими клетками, вызывает разрушение и (или) снижение образования миелиновой оболочки шванновскими клетками, необязательно при этом:

указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Шарко – Мари – Тута (ШМТ); наследственной компрессионной нейропатии (НКН); диабетических и других токсических периферических нейропатий; болезни двигательных нейронов (БДН); предпочтительно при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ), необязательно

при этом указанное заболевание выбрано из: болезни Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1Х); болезни Шарко – Мари – Тута типов 1А-1F (т. е. ШМТ1А, ШМТ1В, ШМТ1С, ШМТ1D, ШМТ1Е и ШМТ1F); болезни Шарко – Мари – Тута типов 4А-4Н (т. е. ШМТ4А, ШМТ4В, ШМТ4С, ШМТ4D, ШМТ4Е, ШМТ4F, ШМТ4G и ШМТ4Н), необязательно при этом: при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1Х (ШМТ1Х), или при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 4С (ШМТ4С).

14. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что введение указанного вирусного вектора приводит к улучшенному функционированию шванновских клеток и (или) повышенному образованию миелиновой оболочки шванновскими клетками по сравнению с образованием миелиновой оболочки шванновскими клетками у данного субъекта до лечения, необязательно при этом указанное повышенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками приводит к улучшенной миелинизации периферических нервов.

15. Вирусный вектор для применения по п. 14, отличающийся тем, что указанное улучшенное функционирование шванновских клеток и (или) указанное повышенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками обнаруживают путем оценки любого одного или большего числа из следующих параметров:

- а) мышечной силы;
- б) скорости проведения в седалищном нерве; и (или)
- с) ответа биомаркеров крови,

и при этом улучшенное функционирование шванновских клеток и (или) повышенное образование миелиновой оболочки шванновскими клетками приводит к улучшению любого одного или большего числа из вышеуказанных параметров по сравнению с таковыми у данного субъекта до лечения или с таковыми у субъектов, не получавших лечения.

16. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный AAV вводят субъекту путем интратекальной инъекции или внутривенной инъекции, предпочтительно отличающийся тем, что указанный AAV вводят путем интратекальной инъекции, необязательно при этом указанный AAV вводят одним из следующих способов: интратекальной инъекцией в поясничный отдел; интратекальной инъекцией в грудной отдел; интратекальной инъекцией в шейный отдел, предпочтительно при этом указанный вирусный вектор вводят путем интратекальной инъекции в поясничный отдел.

17. Вирусный вектор для применения по п. 16, отличающийся тем, что указанный AAV вводят путем однократной интратекальной инъекции.

18. Вирусный вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что субъект, нуждающийся в этом, представляет собой человека.

19. Вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов.

20. Клетка, трансдуцированная вирусным вектором, заявленным в любом из предшествующих пунктов, необязательно при этом указанная клетка представляет собой шванновскую клетку.

21. Минимальный специфичный в отношении миелина промотор, при этом указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор представляет собой минимальный промотор миелинового белка ноль (Mpz), необязательно при этом указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, необязательно – которая по меньшей мере на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% идентична или гомологична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22, или минимальный специфичный в отношении миелина промотор, содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.

22. Минимальный специфичный в отношении миелина промотор человека, при этом указанный минимальный специфичный в отношении миелина промотор человека имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 22.

23. Полинуклеотидная конструкция, содержащая:

первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая представляет собой специфичный в отношении шванновских клеток промотор, необязательно при этом указанный специфичный в отношении шванновских клеток промотор представляет собой:

- а) полноразмерный промотор Mrz, необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18; или
- б) минимальный специфичный в отношении шванновских клеток промотор, необязательно – минимальный промотор Mrz по любому из п. 21 или п. 22; функционально связанный со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, при этом указанная вторая нуклеиновая кислота транскрибируется в первый полинуклеотид, и при этом указанная вторая нуклеиновая кислота: а) представляет собой открытую рамку считывания или кДНК, или другие элементы гена; или б) транскрибируется в некодирующую РНК.
24. Вирусный вектор, содержащий:
- а) минимальный специфичный в отношении миелина промотор по любому из п. 21 или п. 22;
- б) полноразмерный промотор Mrz, необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18; или
- с) или полинуклеотидную конструкцию по п. 23.
25. Вирусный вектор для применения по любому из пп. 1-18 или вирусный вектор по п. 24, отличающийся тем, что указанный вектор обладает способностью трансдуцировать шванновские клетки, и (или) отличающийся тем, что указанный вектор не интегрируется в геном клетки-хозяина.
26. Вирусный вектор по п. 25, содержащий:
- а) AAV, необязательно при этом указанный AAV представляет собой AAV9;
- б) вектор AAV - Mrz.Egfp, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mrz) и репортерный ген EGFP, необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%,

- или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18;
- b) вектор AAV9 - Mpz - GJB1, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль (Mpz) и открытую рамку считывания гена целевого контакта бета 1 (GJB1), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 18;
- d) вектор AAV9 - miniMpz.Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMpz) и репортерный ген EGFP, необязательно при этом указанный промотор miniMpz имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22;
- e) вектор AAV9 - Mpz человека - GJB1, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена целевого контакта бета 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 17);
- f) вектор AAV9 - Mpz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 19);
- g) вектор AAV9 - miniMpz - SH3TC2.myc.ITR, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (Mpz) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 20);
- h) вектор AAV9 - miniMpz человека - SH3TC2, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и открытую рамку считывания (OPC) гена SH3TC2 (SEQ ID NO. 21);
- i) вектор AAV9 - miniMpz человека - Egfp, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль человека (hP0) и репортерный ген EGFP (SEQ ID NO. 23); или
- j) вектор AAV9 - Mpz - GJB1, содержащий вектор AAV9, минимальный промотор миелинового белка ноль (miniMpz) и открытую рамку считывания (OPC) гена целевого контакта бета 1 (GJB1), необязательно при этом указанный промотор miniMPZ имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор по любому из предшествующих пунктов, необязательно содержащая терапевтически подходящее количество указанного вирусного вектора и дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель и (или) эксципиент.

28. Применение вирусного вектора по любому из предшествующих пунктов в способе производства медицинского препарата для лечения или профилактики заболевания, связанного со шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание вызывает разрушение и (или) снижение образования миелиновой оболочки шванновскими клетками, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута, необязательно при этом указанная болезнь Шарко – Мари – Тута представляет собой болезнь, выбранную из группы, состоящей из: болезни Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X); болезни Шарко – Мари – Тута типов 1A-1F (т. е. ШМТ1А, ШМТ1В, ШМТ1С, ШМТ1D, ШМТ1Е и ШМТ1F); болезни Шарко – Мари – Тута типов 4А-4Н (т. е. ШМТ4А, ШМТ4В, ШМТ4С, ШМТ4D, ШМТ4Е, ШМТ4F, ШМТ4G и ШМТ4Н), необязательно при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X), или при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 4С (ШМТ4С).

29. Вирусный вектор или полинуклеотидная конструкция по любому из предшествующих пунктов для применения в системе CRISPR/Cas9, при этом указанный вирусный вектор или полинуклеотид содержит любой один или большее число из следующего:

- a) полинуклеотид, кодирующий единую гидовую РНК (егРНК), нацеленную на представляющий интерес ген;
- b) полинуклеотид, кодирующий полипептид Cas9;
- c) полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид.

30. Вирусный вектор по любому из предшествующих пунктов для применения в:

- a) способе мечения шванновских клеток, например, мечения флуоресцентным белком, например, зеленым флуоресцентным белком (GFP) или усиленным зеленым флуоресцентным белком (EGFP), или другим нефлуоресцентным репортером,

необязательно при этом указанное мечение шванновских клеток может применяться в способе диагностики заболевания, связанного со шванновскими клетками;

b) способе, при котором шванновские клетки индуцируют к дифференцировке в клетки альтернативного типа (например, в олигодендроциты, астроциты или нейроны); или

c) способе стимуляции шванновских клеток для поддержания регенерации у субъекта, нуждающегося в этом, необязательно – после повреждения или травмы.

31. Набор для применения в профилактике или лечении заболевания, связанного со шванновскими клетками, мечения шванновских клеток или регенерации шванновских клеток, при этом указанный набор содержит один или большее число из следующего:

- a) вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов;
- b) полинуклеотидную конструкцию, как определено в п. 23;
- c) вирусный вектор;
- d) вирусный вектор, содержащий полинуклеотидную конструкцию, как определено в п. 23;
- e) фармацевтически приемлемый носитель и (или) эксципиент;
- f) одноразовый шприц, например, одноразовый шприц, подходящий для интратекальной инъекции в поясничный отдел;
- g) инструкцию по применению,

необязательно при этом указанный набор содержит больше чем один вирусный вектор, как определено в любом из предшествующих пунктов, необязательно при этом указанный набор содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных вирусных векторов, как определено в любом из предшествующих пунктов.

32. Вирусный вектор для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного со шванновскими клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный вирусный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть транскрибирована в первый полинуклеотид, и при этом экспрессия указанного первого полинуклеотида находится под контролем:

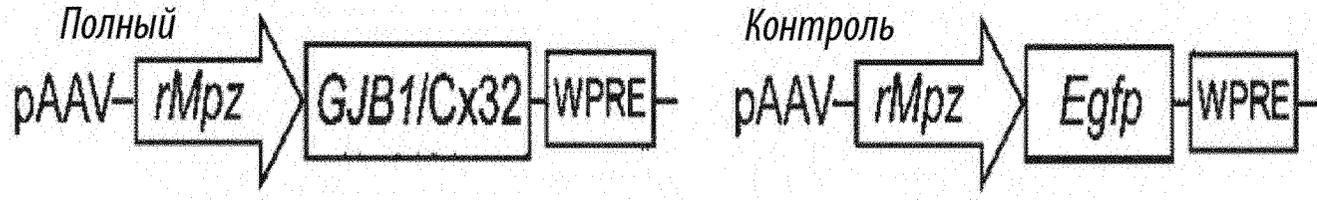
- a) минимального промотора миелинового белка ноль (Mpz), необязательно при этом указанный промотор имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на

94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 4 или с SEQ ID NO. 1; или

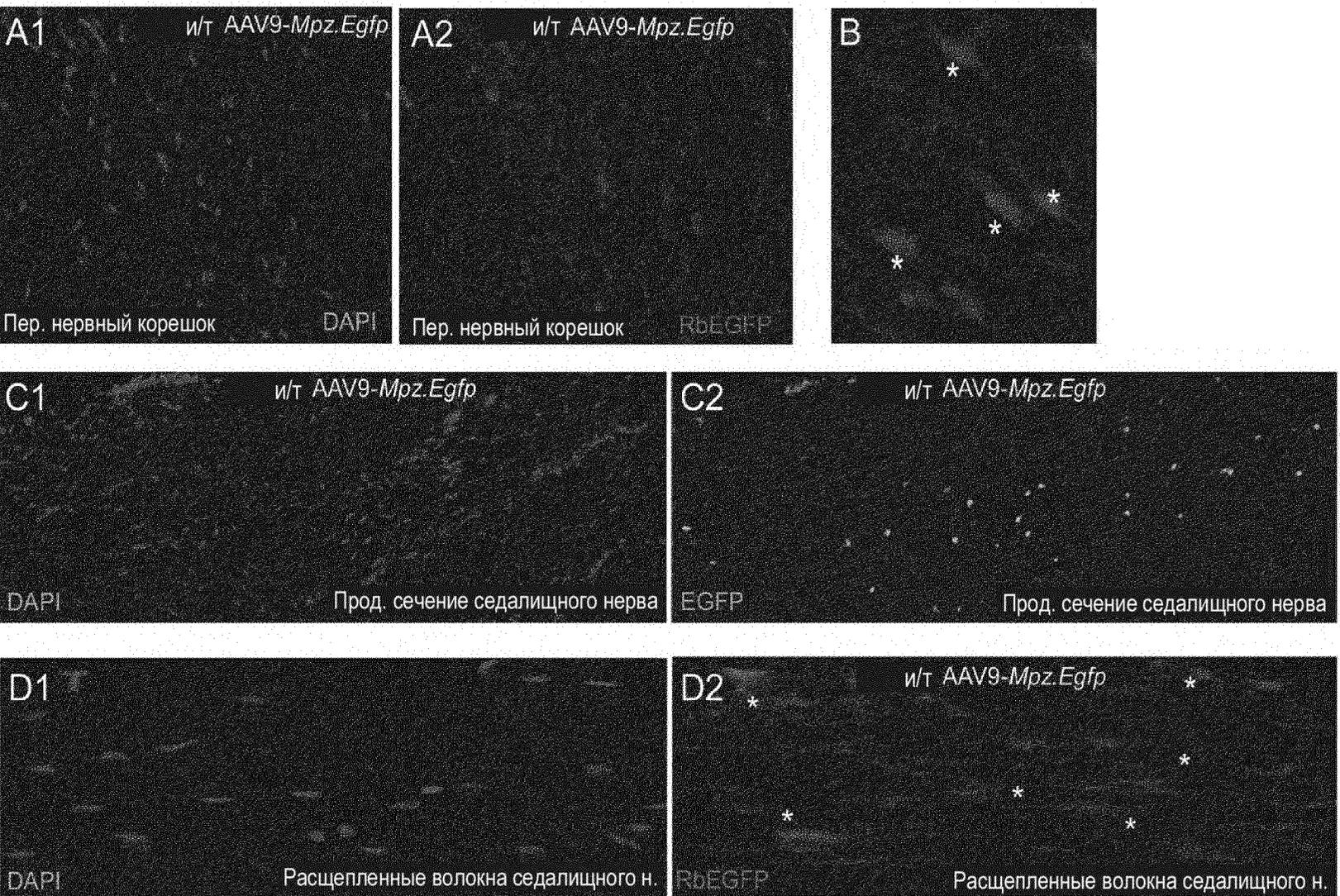
b) минимального специфичного в отношении миелина промотора (miniMpz), который включает в себя или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22), необязательно при этом указанный промотор miniMPZ имеет последовательность, которая по меньшей мере на 75%, на 80%, или на 82%, или на 84%, или на 86%, или на 88%, или на 90%, или на 92%, или на 94%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 100% гомологична или идентична последовательности с SEQ ID NO. 5 или с SEQ ID NO. 22.

33. Вирусный вектор для применения по п. 32, отличающийся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или AAV.

34. Вирусный вектор для применения по любому из п. 32 или п. 33, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное со шванновскими клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута (ШМТ), необязательно при этом указанное заболевание выбрано из: болезни Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X); болезни Шарко – Мари – Тута типов 1A-1F (т. е. ШМТ1А, ШМТ1В, ШМТ1С, ШМТ1D, ШМТ1Е и ШМТ1F); болезни Шарко – Мари – Тута типов 4А-4Н (т. е. ШМТ4А, ШМТ4В, ШМТ4С, ШМТ4D, ШМТ4Е, ШМТ4F, ШМТ4G и ШМТ4Н), необязательно при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 1X (ШМТ1X), или при этом указанное заболевание представляет собой болезнь Шарко – Мари – Тута типа 4С (ШМТ4С).



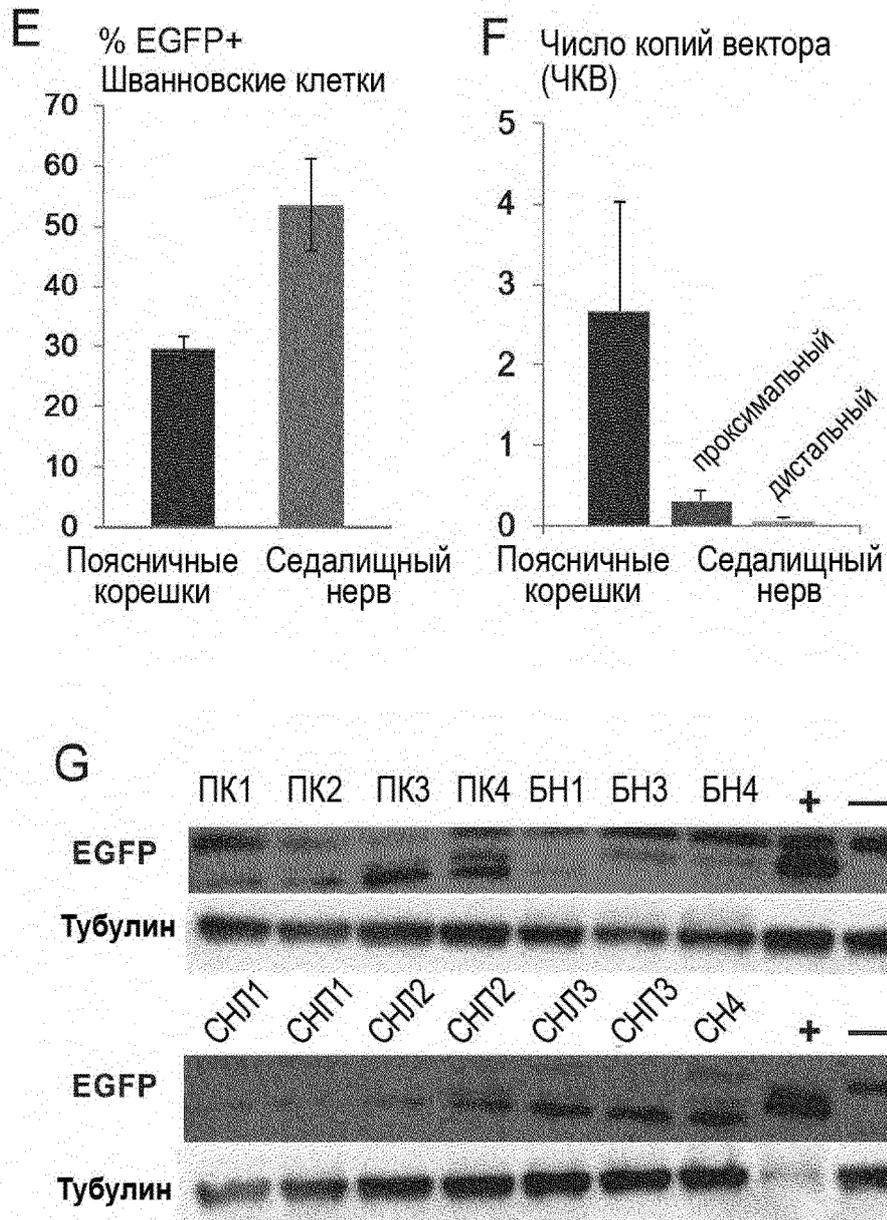
Фиг. 1



Фиг. 2
(часть 1/2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

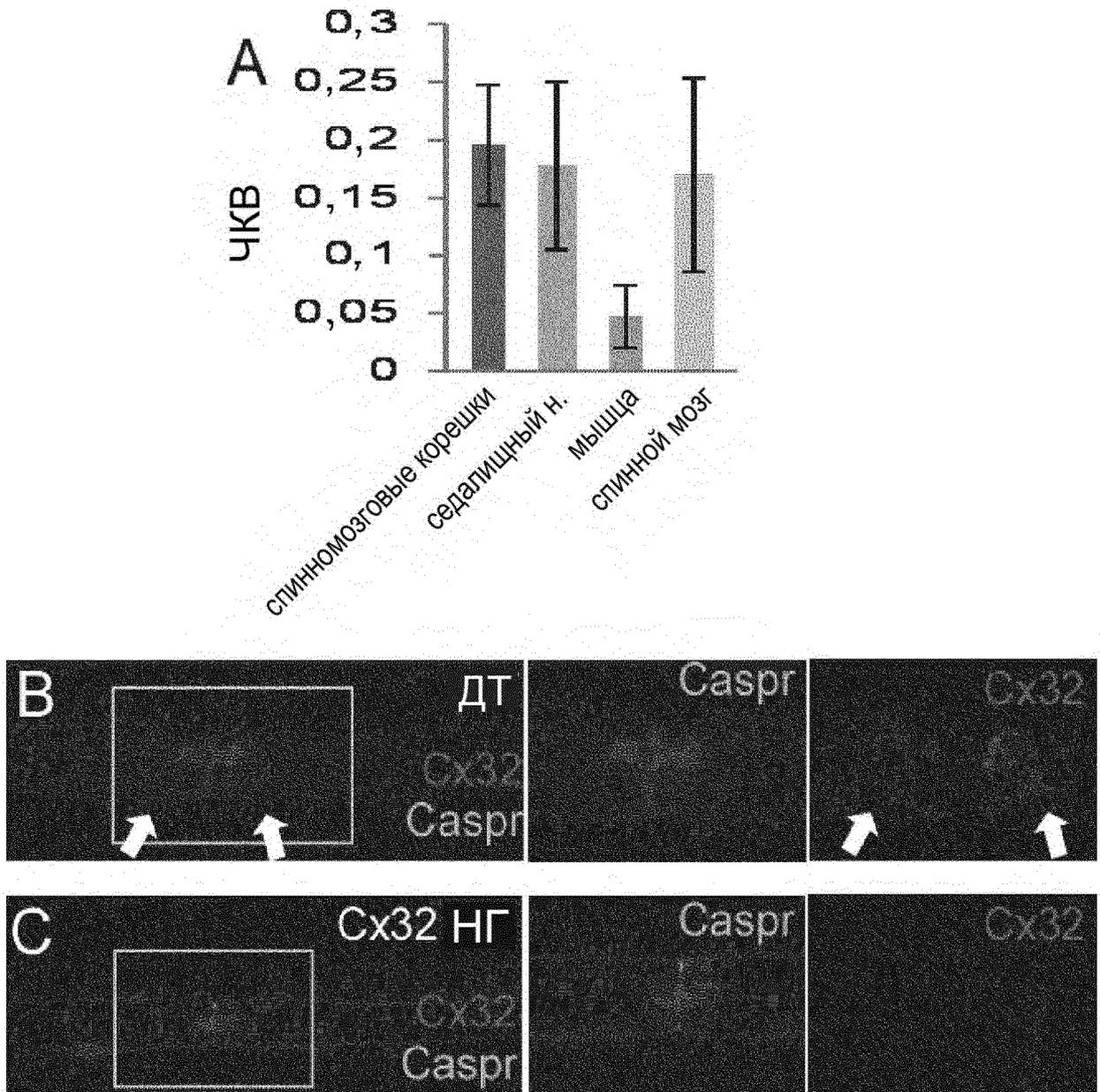
3/26



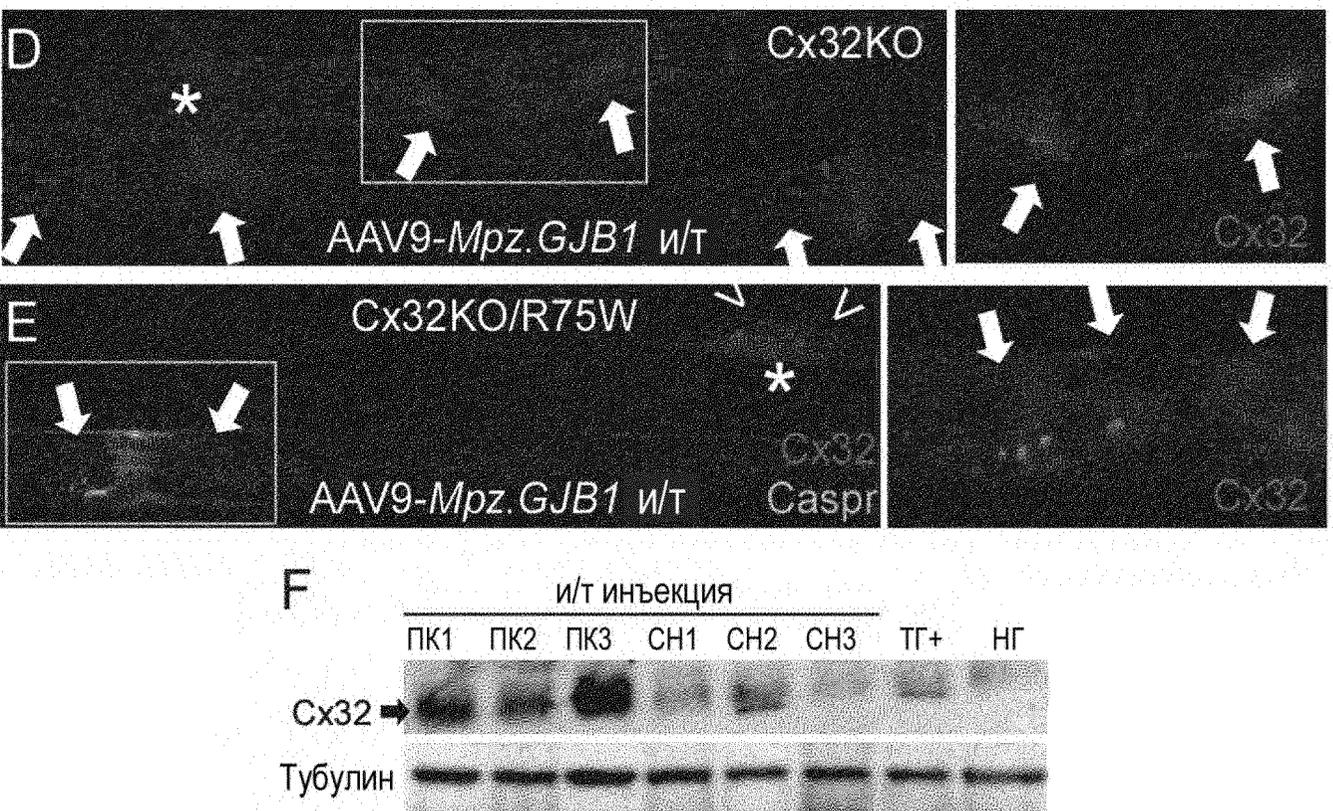
Фиг. 2
(часть 2/2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

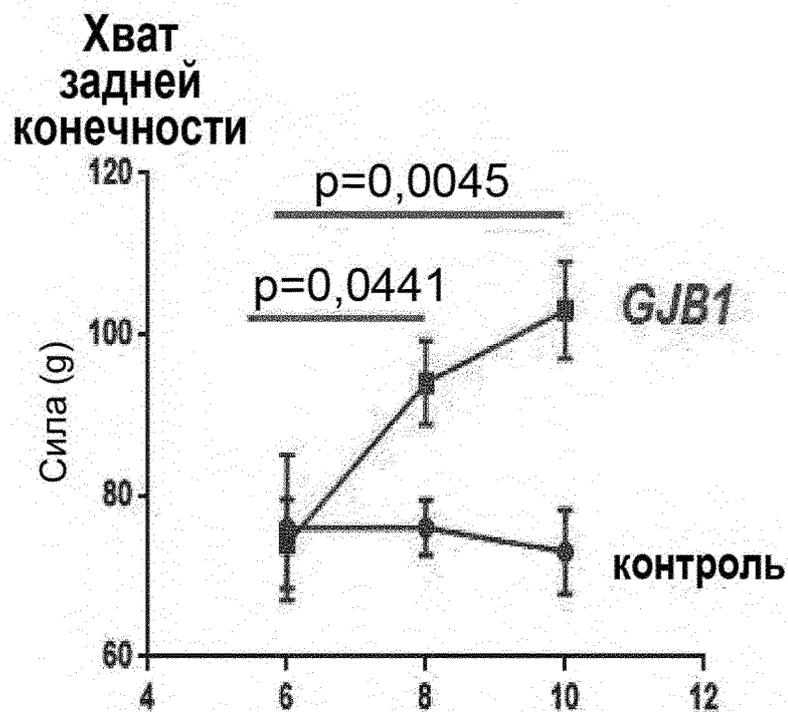
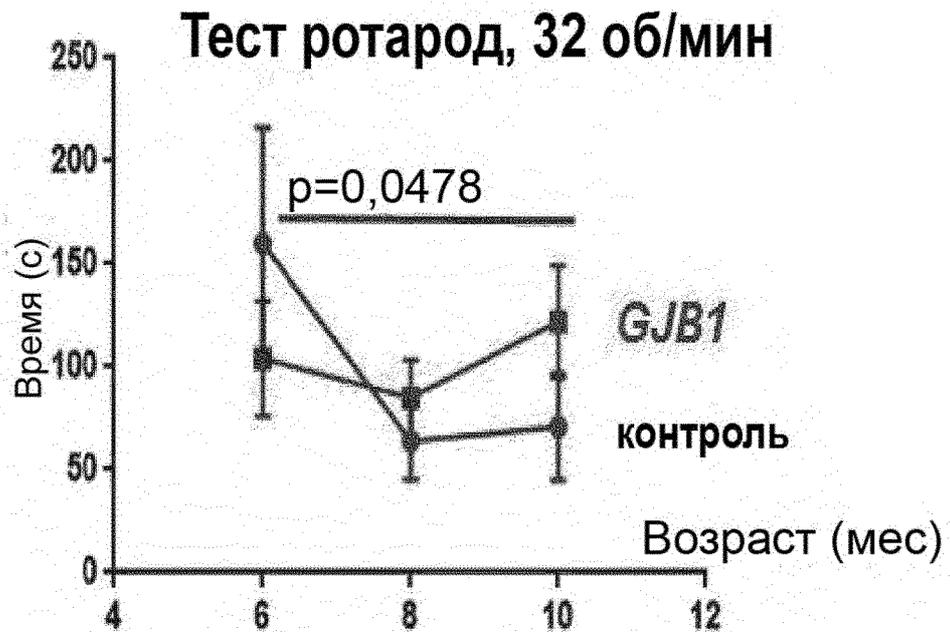
4/26



Фиг. 3
(часть 1/2)



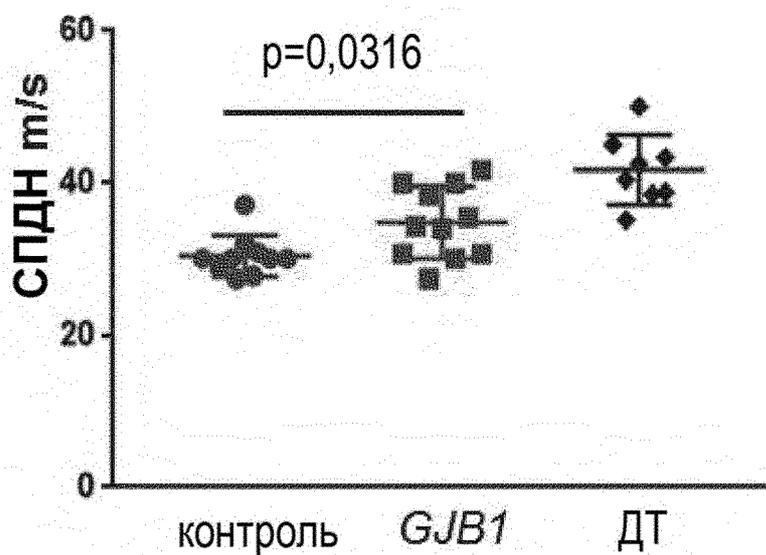
ФИГ. 3
(часть 2/2)



Фиг. 4

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

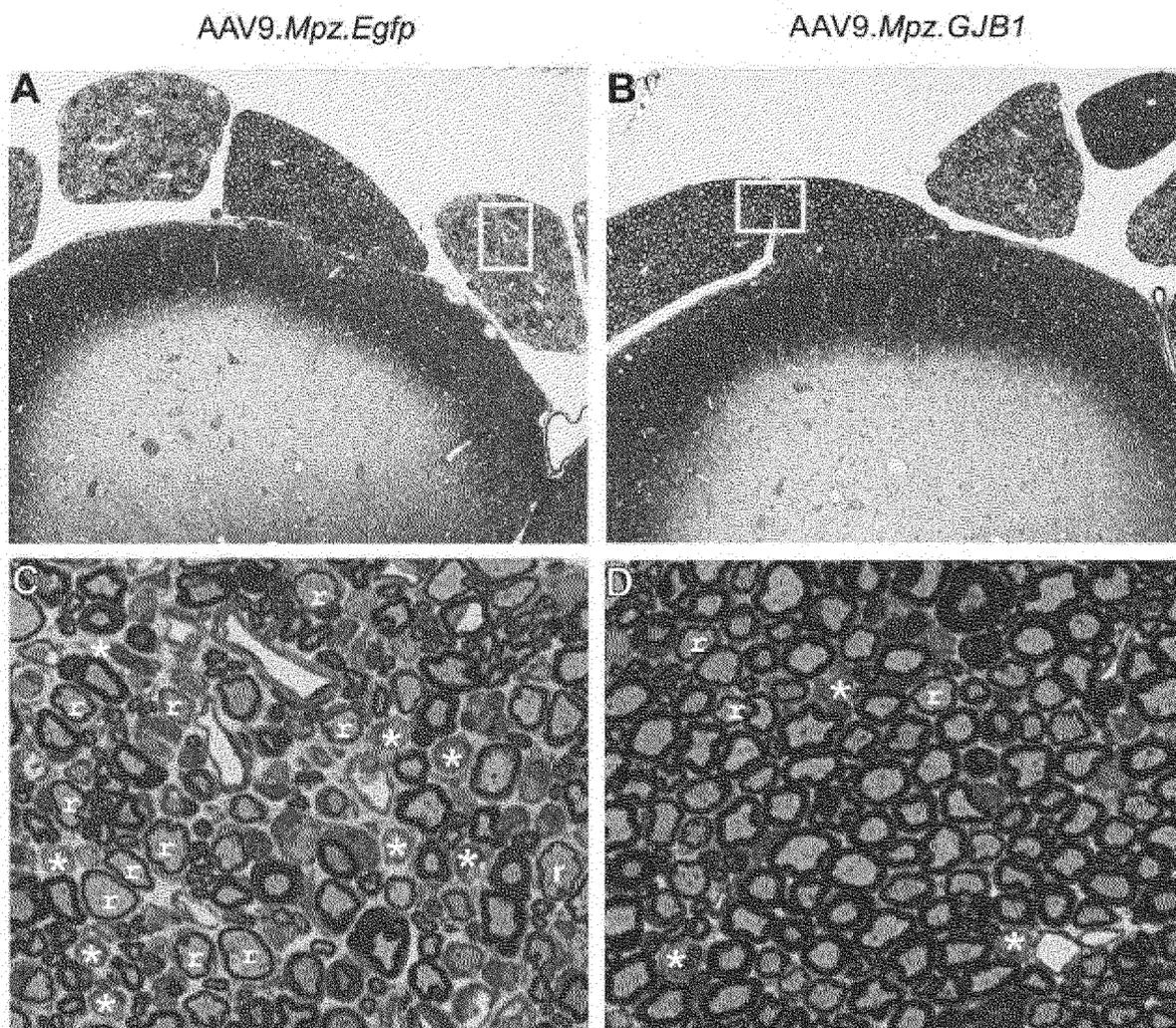
7/26



Фиг. 5

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

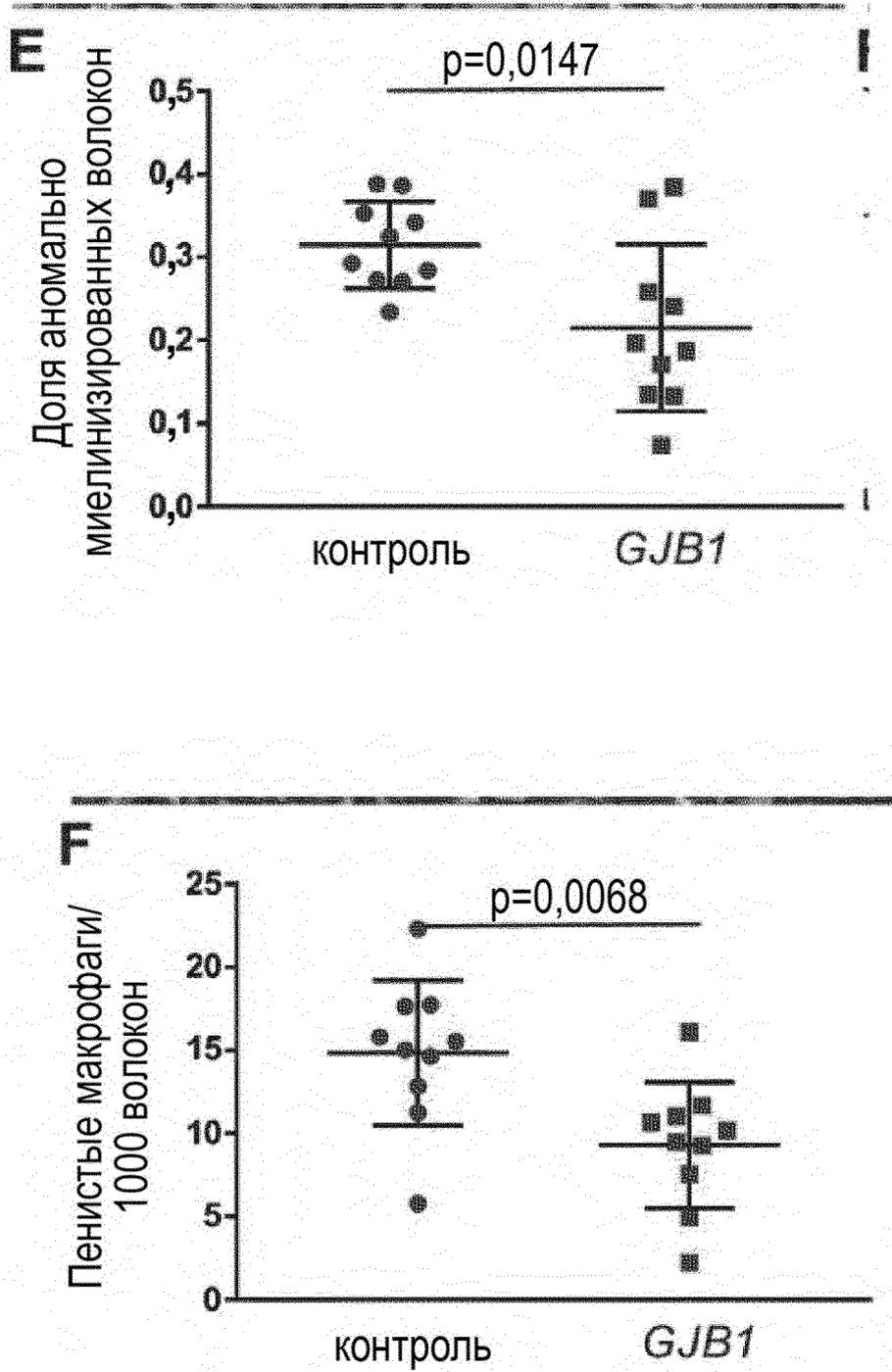
8/26



Фиг. 6
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

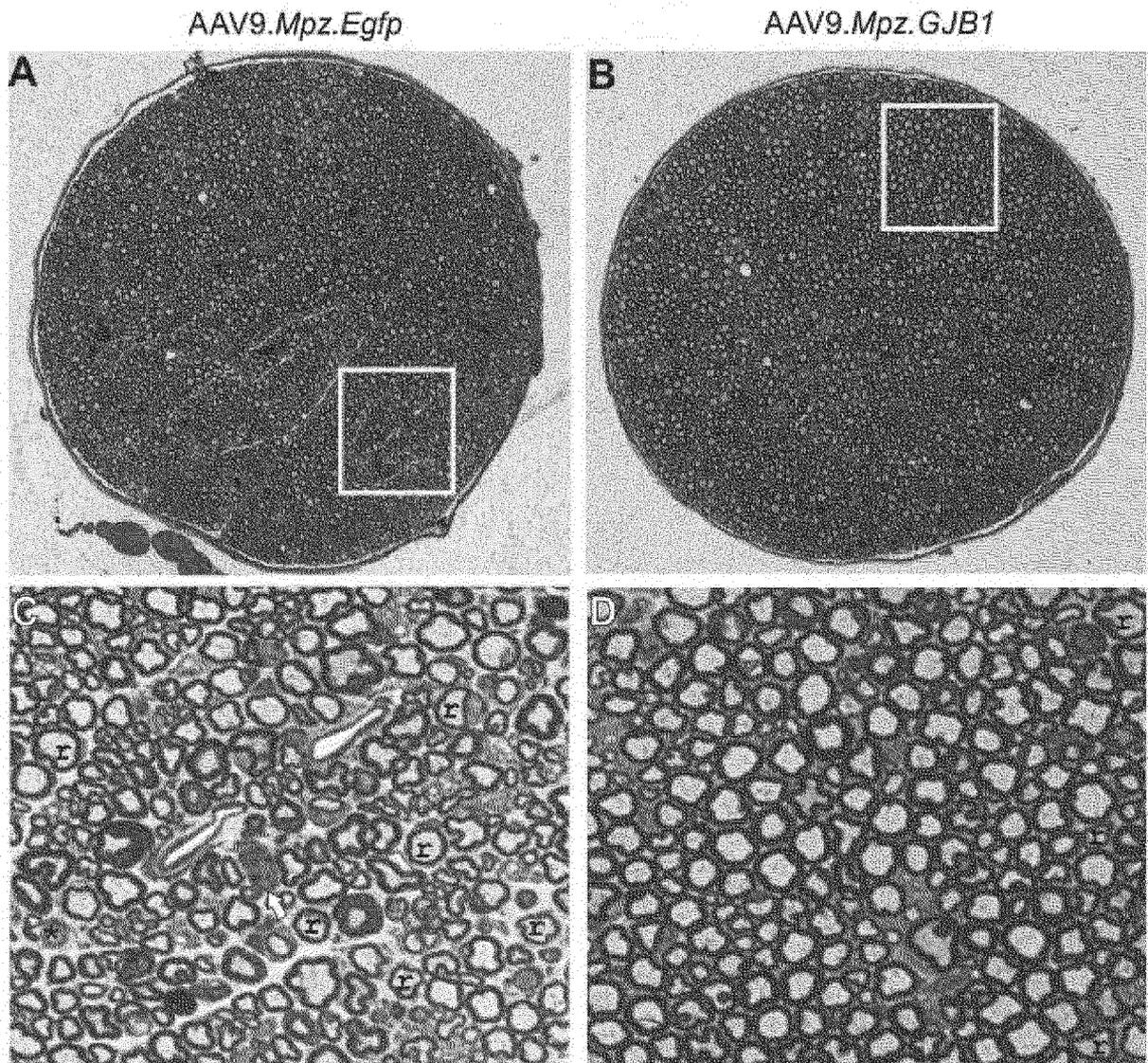
9/26



Фиг. 6
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

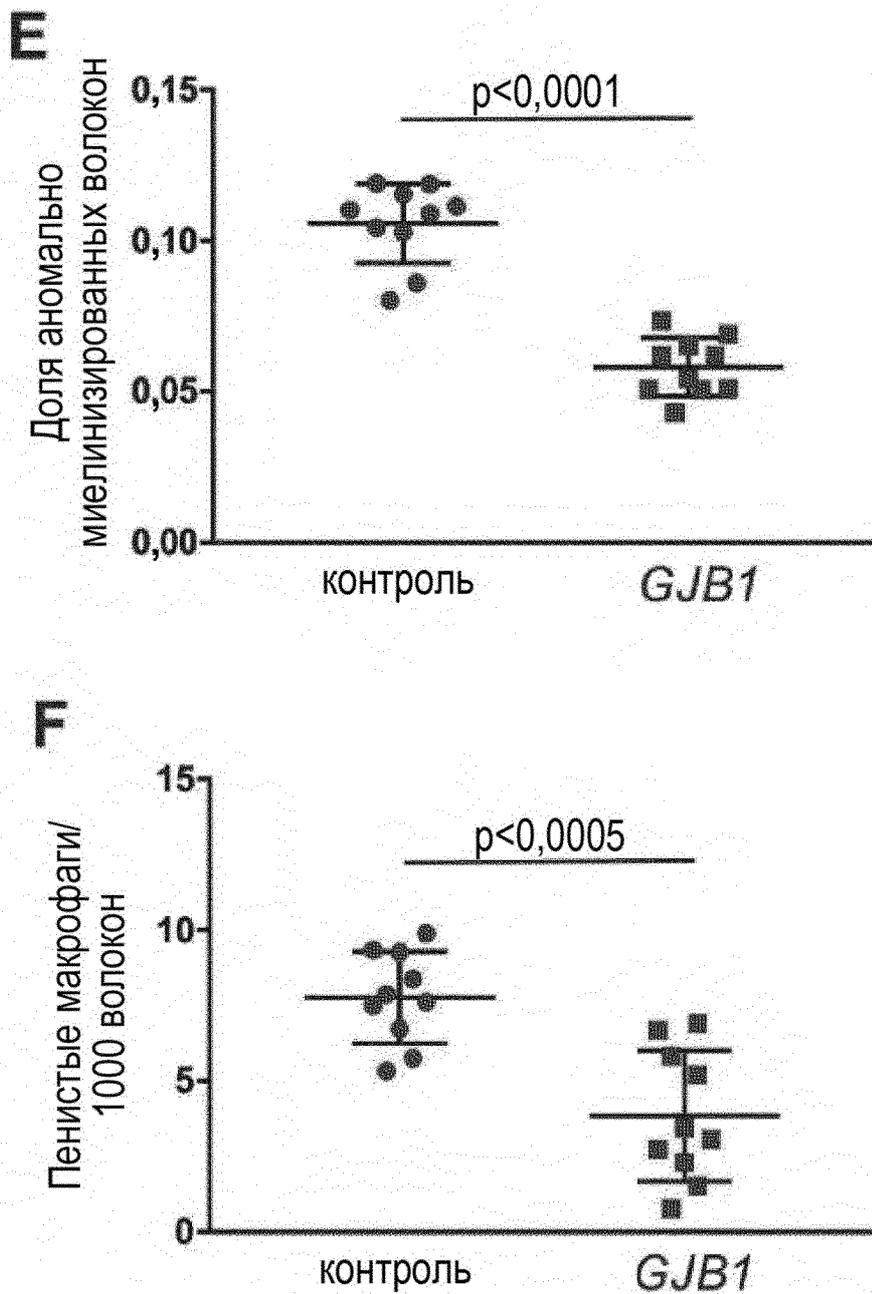
10/26



Фиг. 7
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

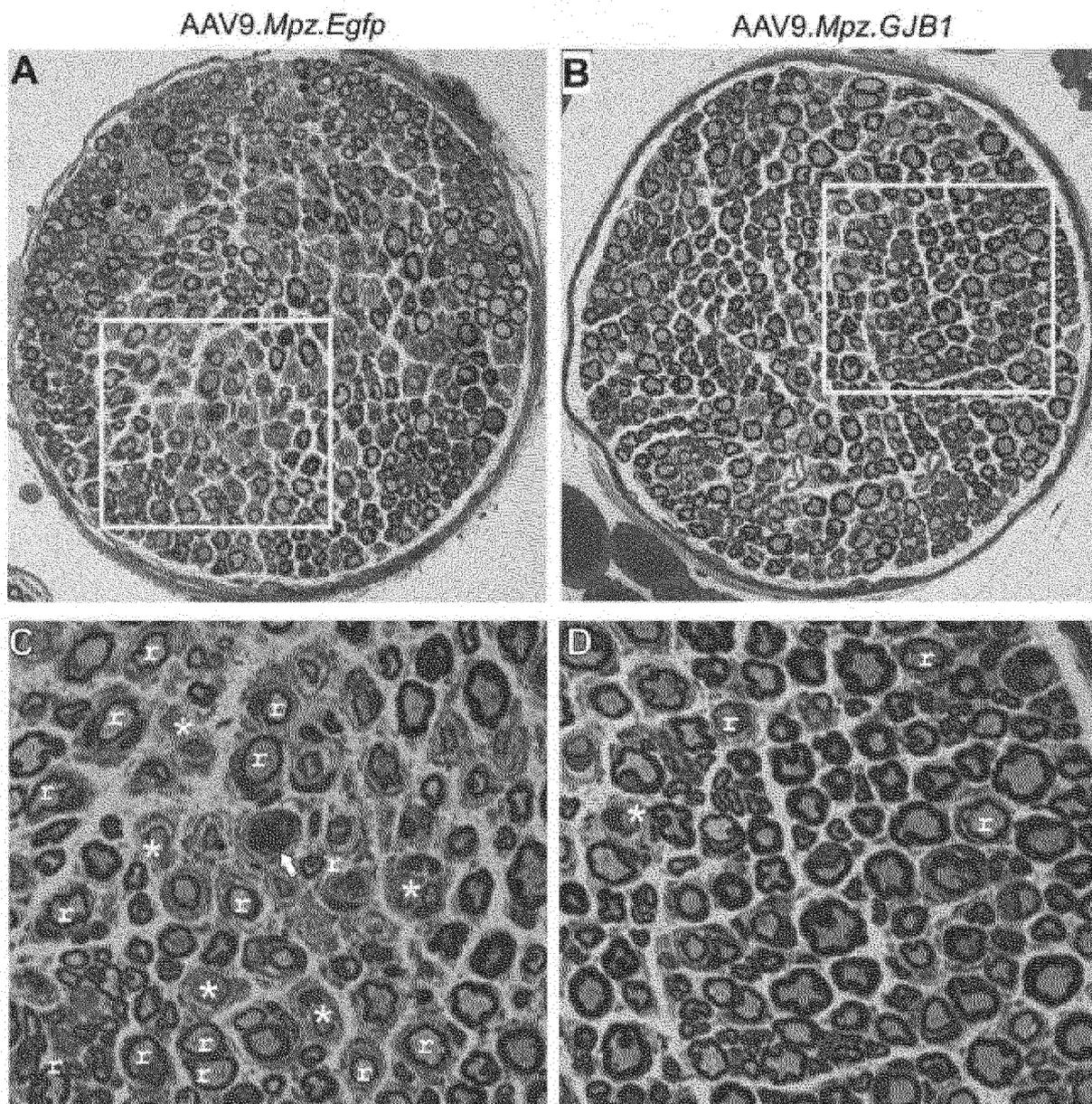
11/26



Фиг. 7
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

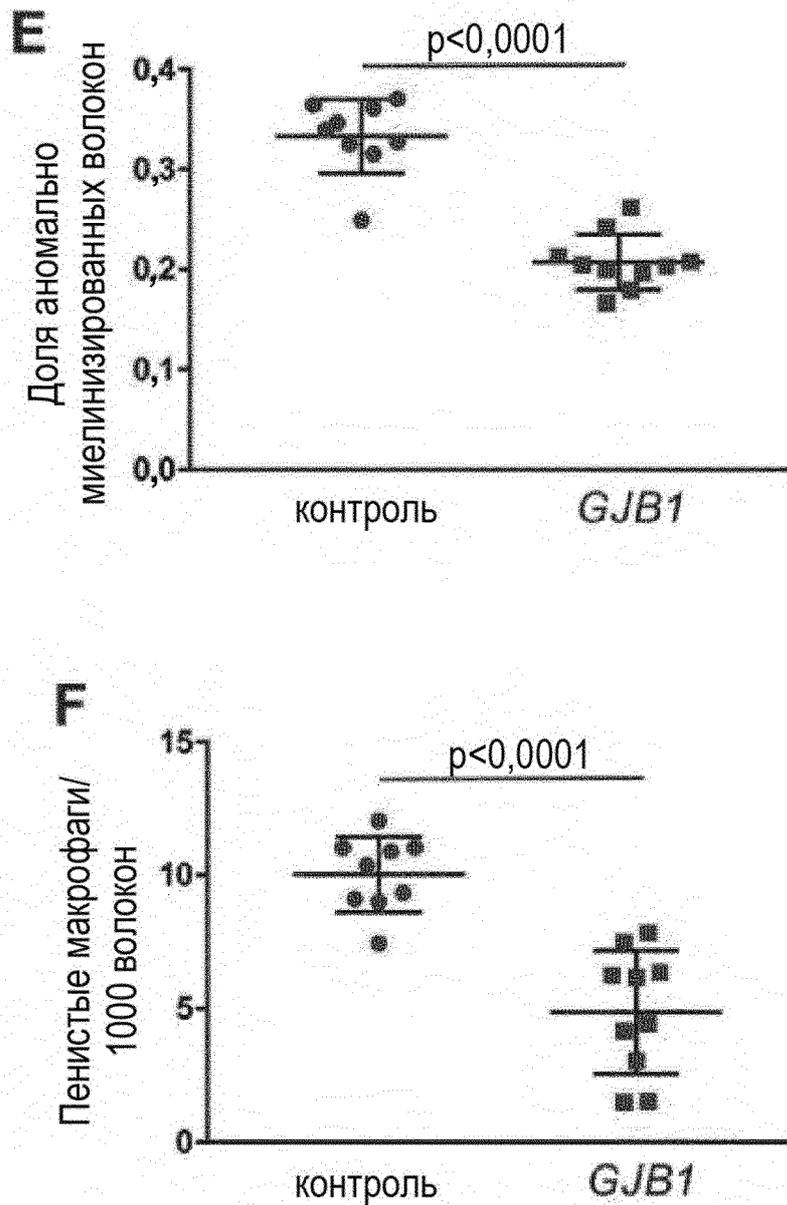
12/26



Фиг. 8
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

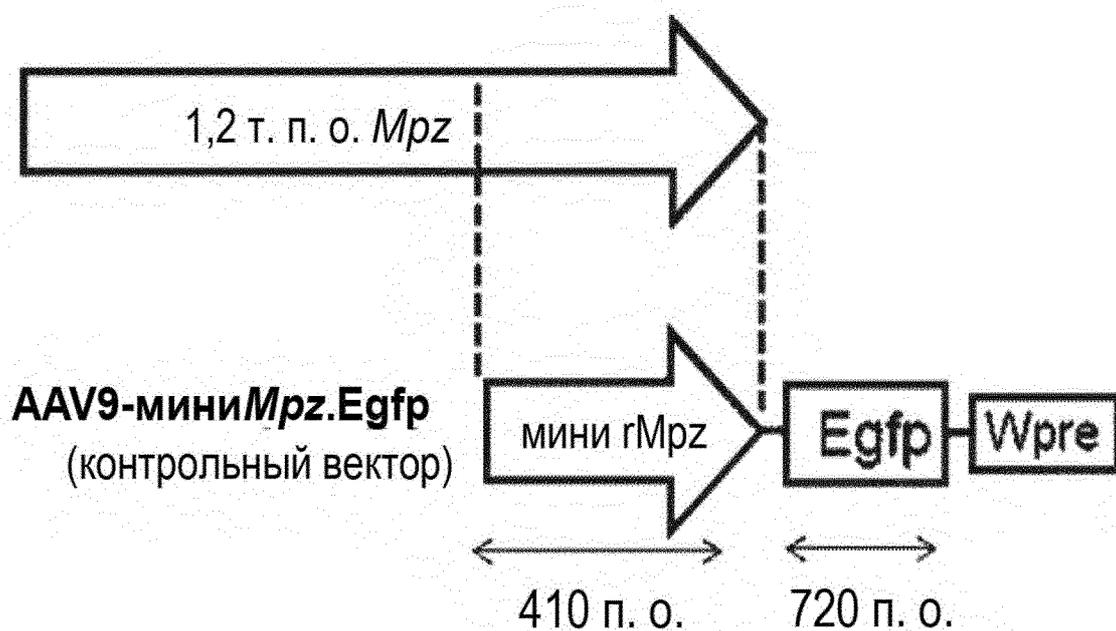
13/26



Фиг. 8
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

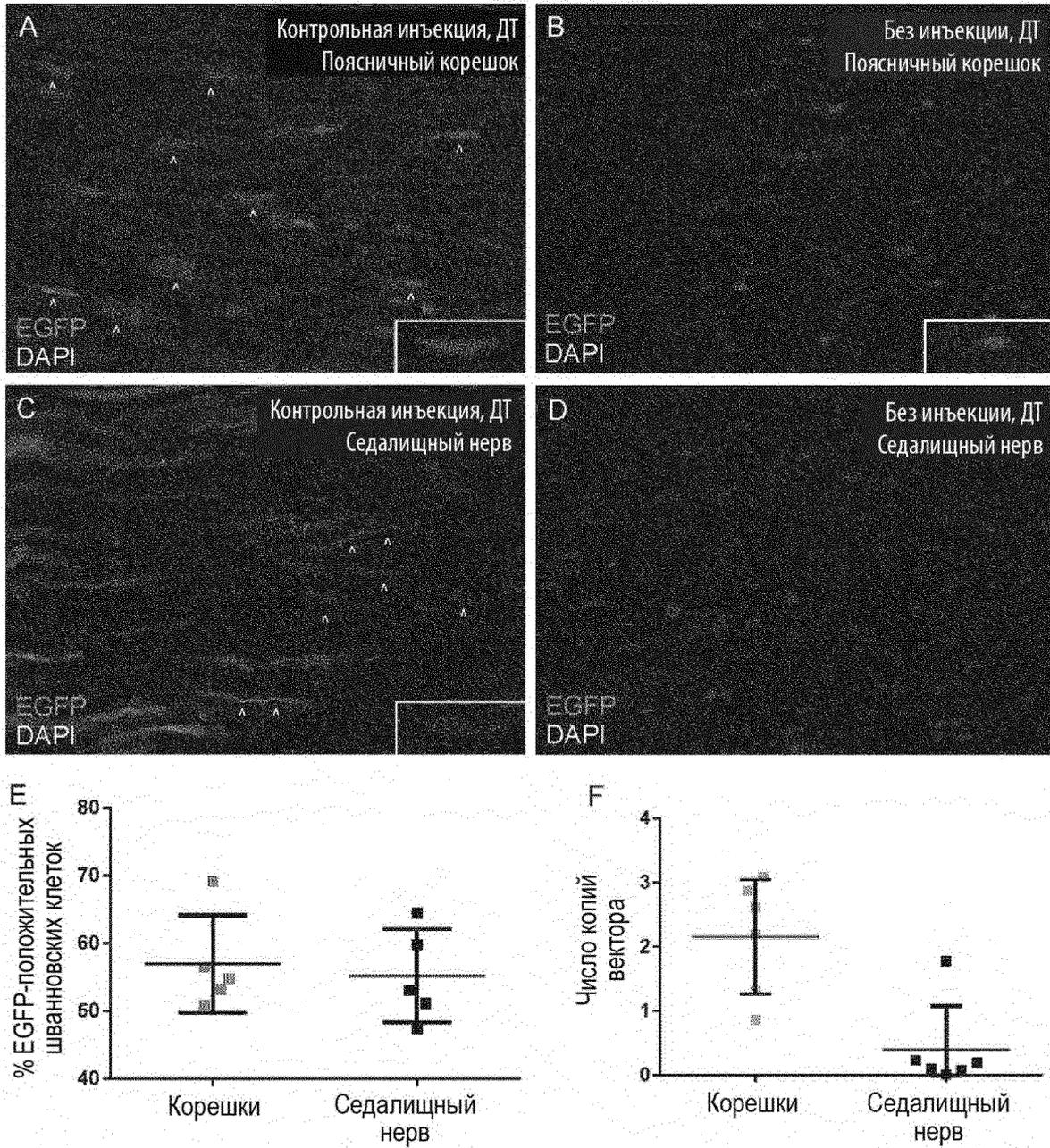
14/26



Фиг. 9

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

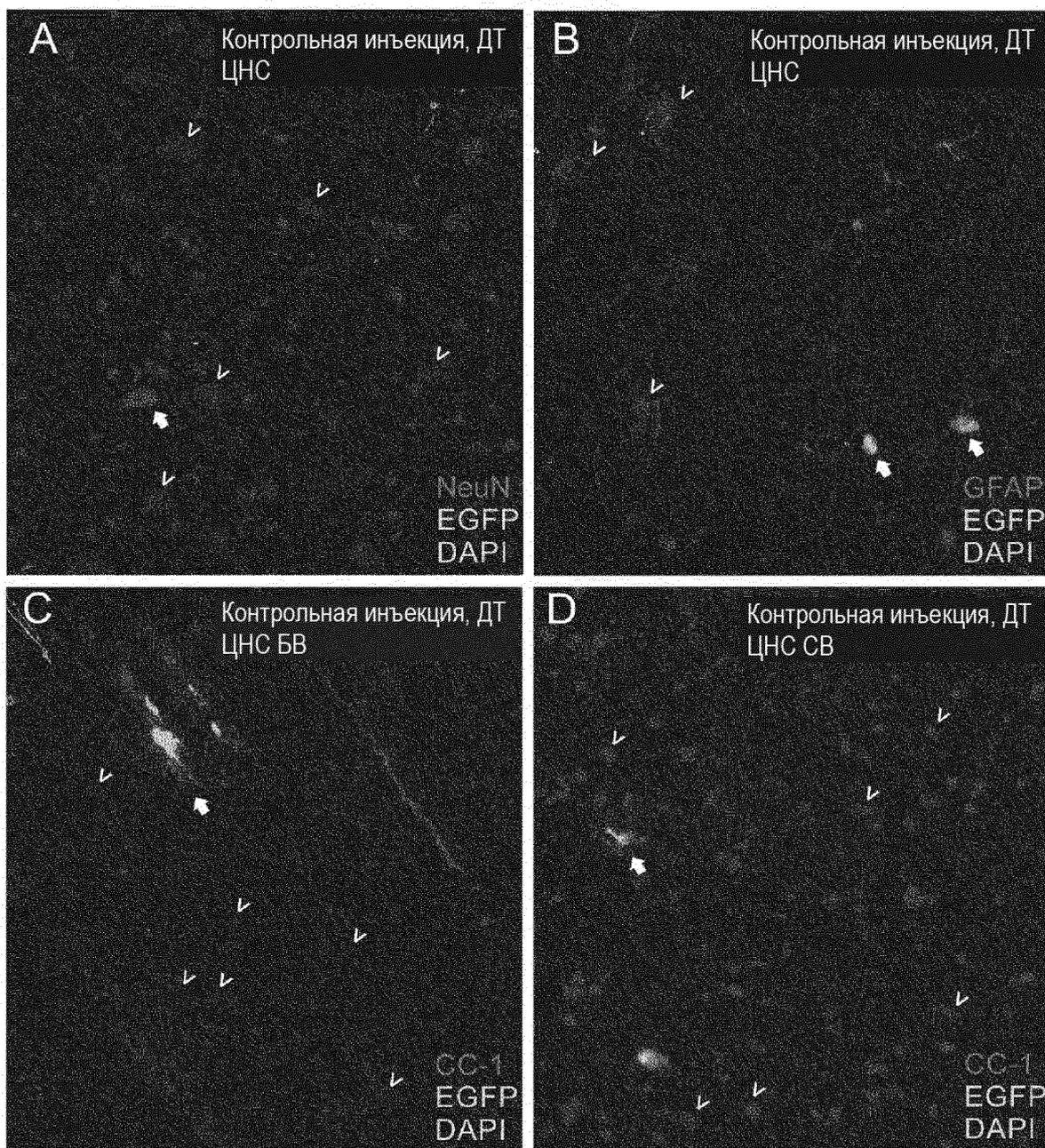
15/26



Фиг. 10

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

16/26

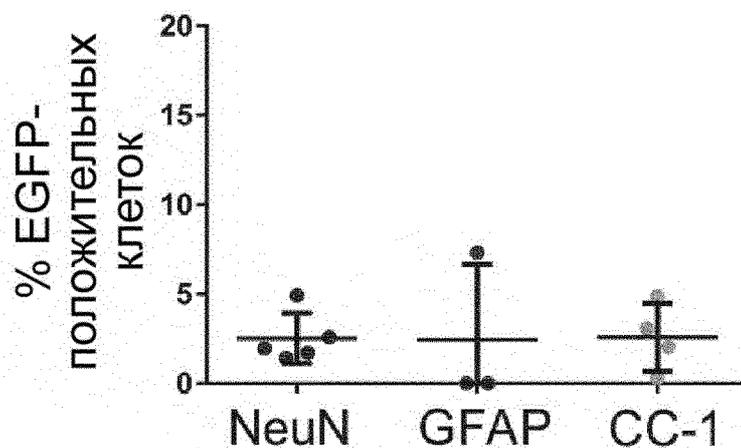


Фиг. 11
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

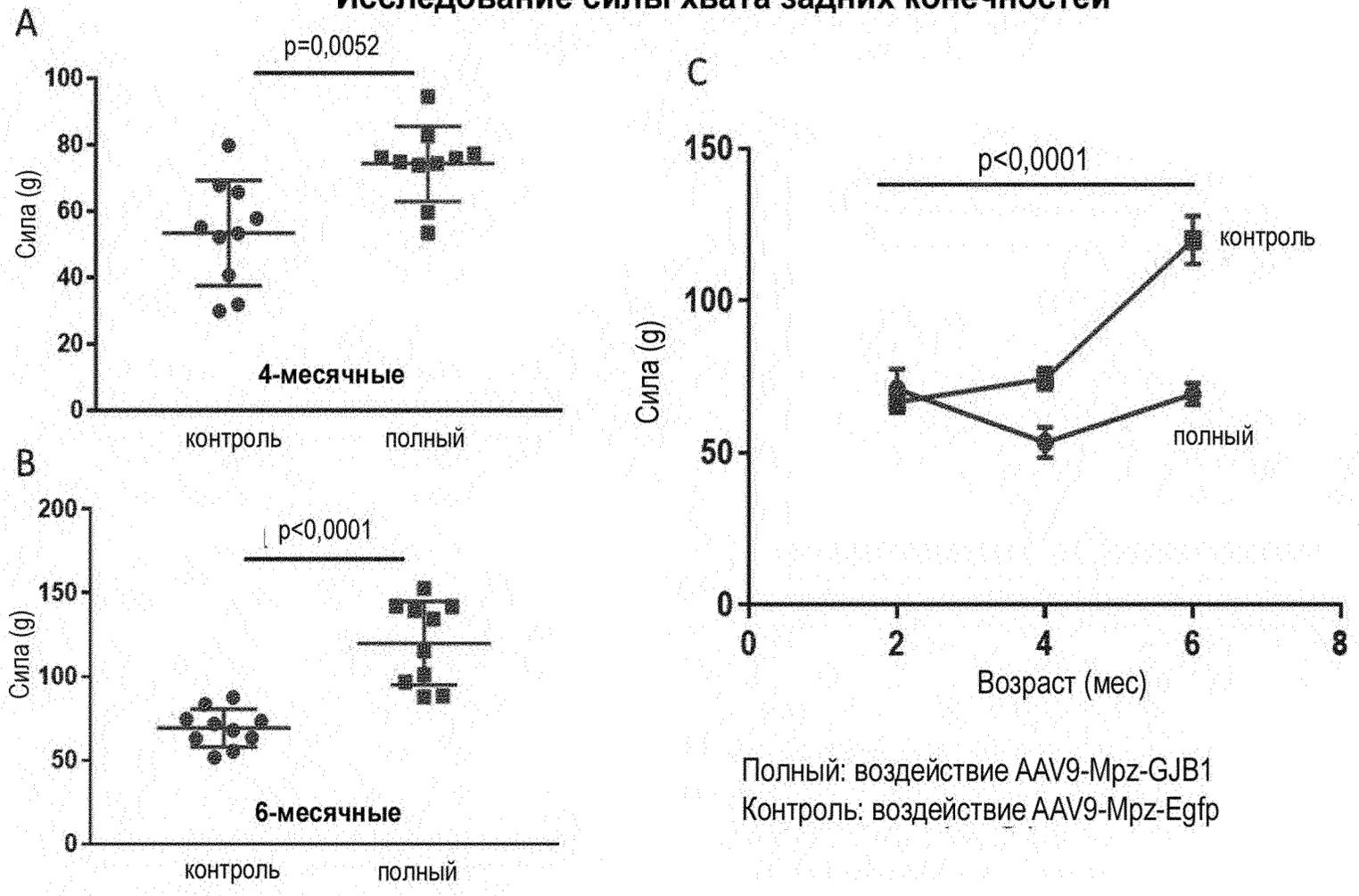
17/26

E



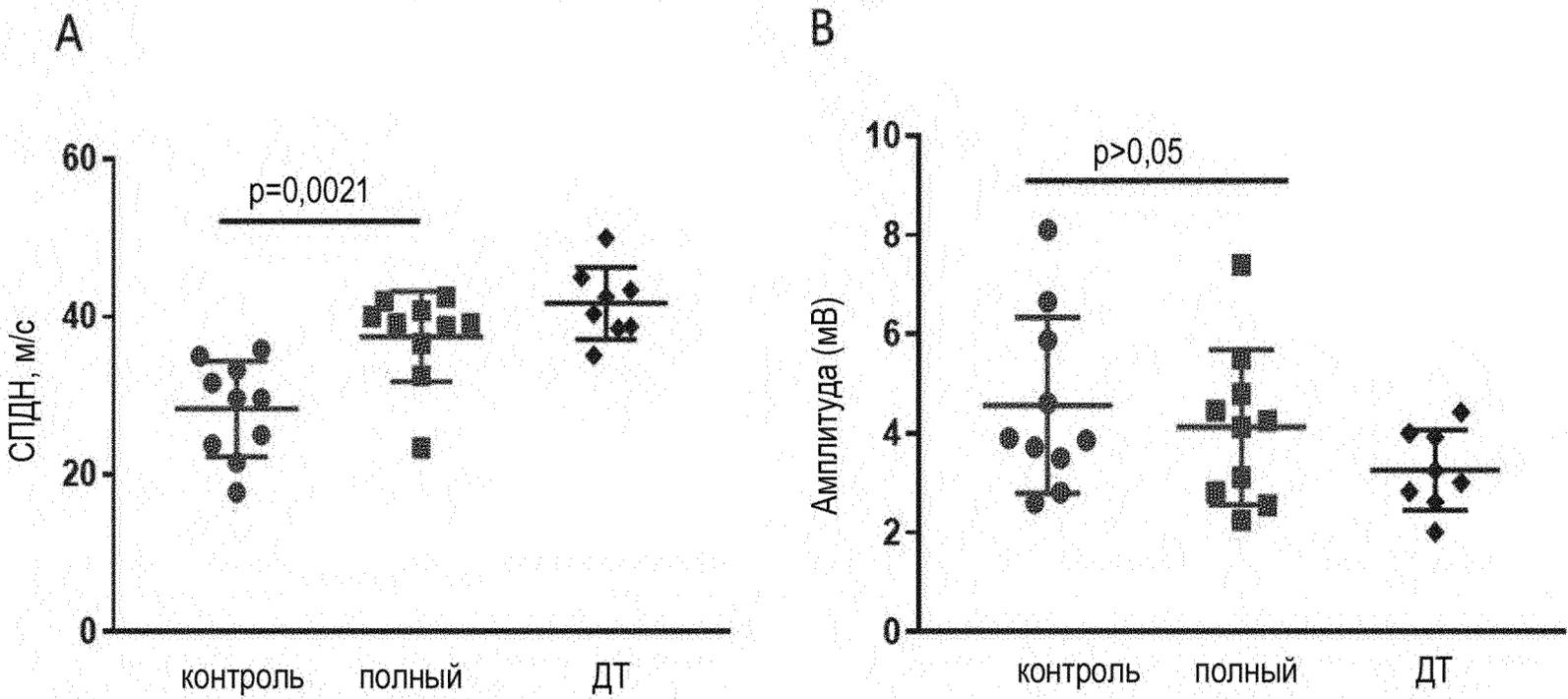
Фиг. 11
(часть 2 из 2)

Исследование силы хвата задних конечностей



ФИГ. 12

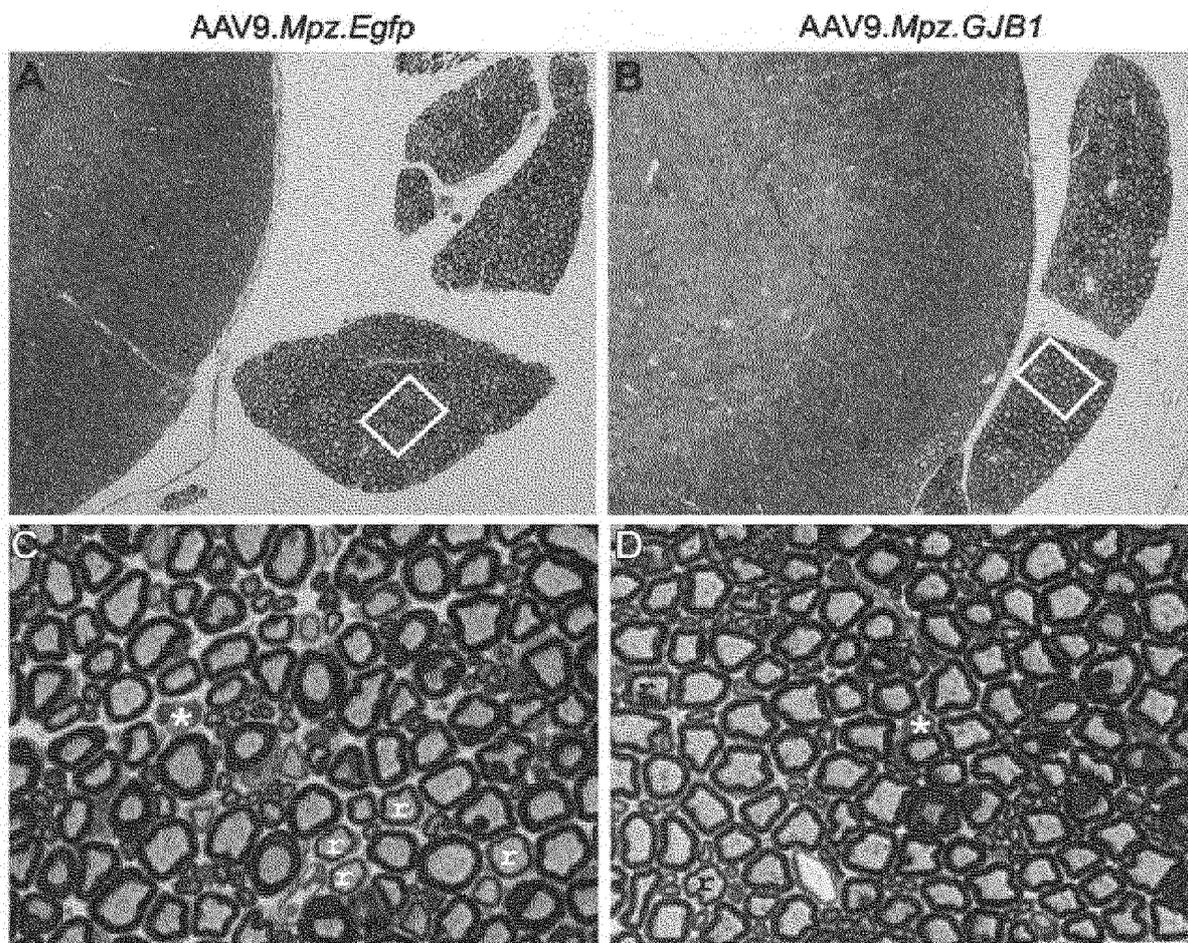
Исследование проводимости седалищного двигательного нерва



Фиг. 13

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

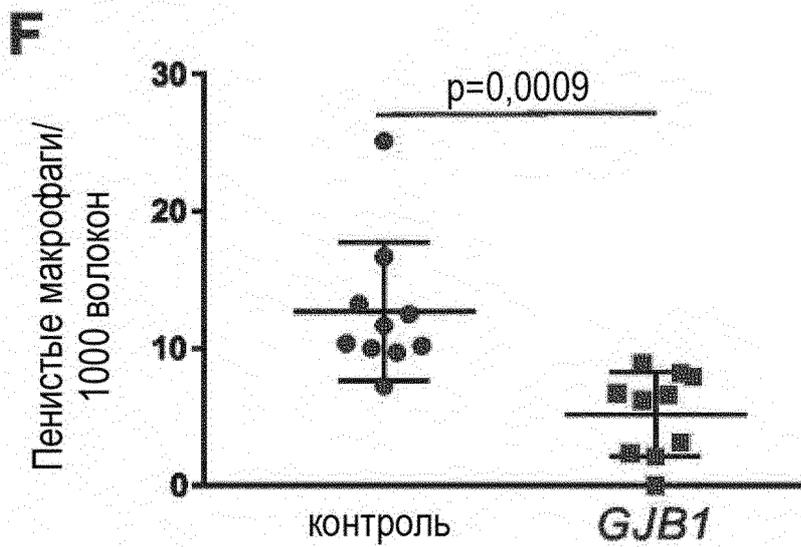
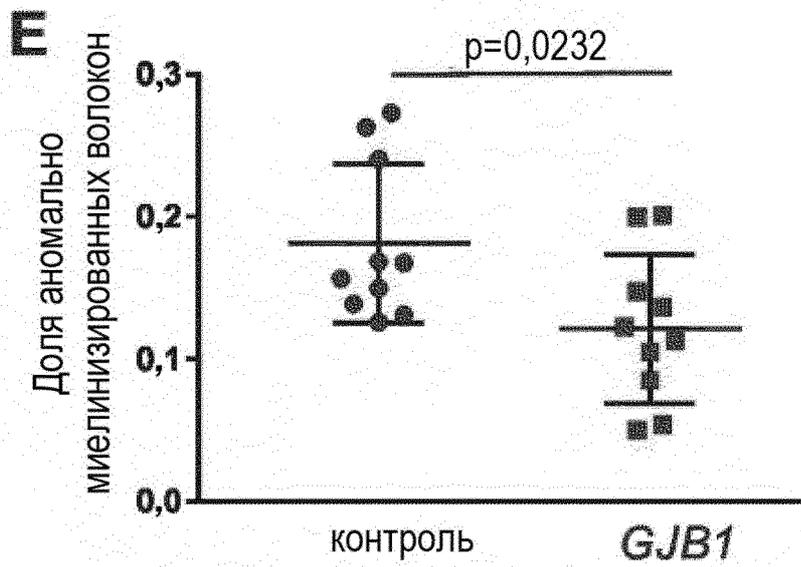
20/26



Фиг. 14
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

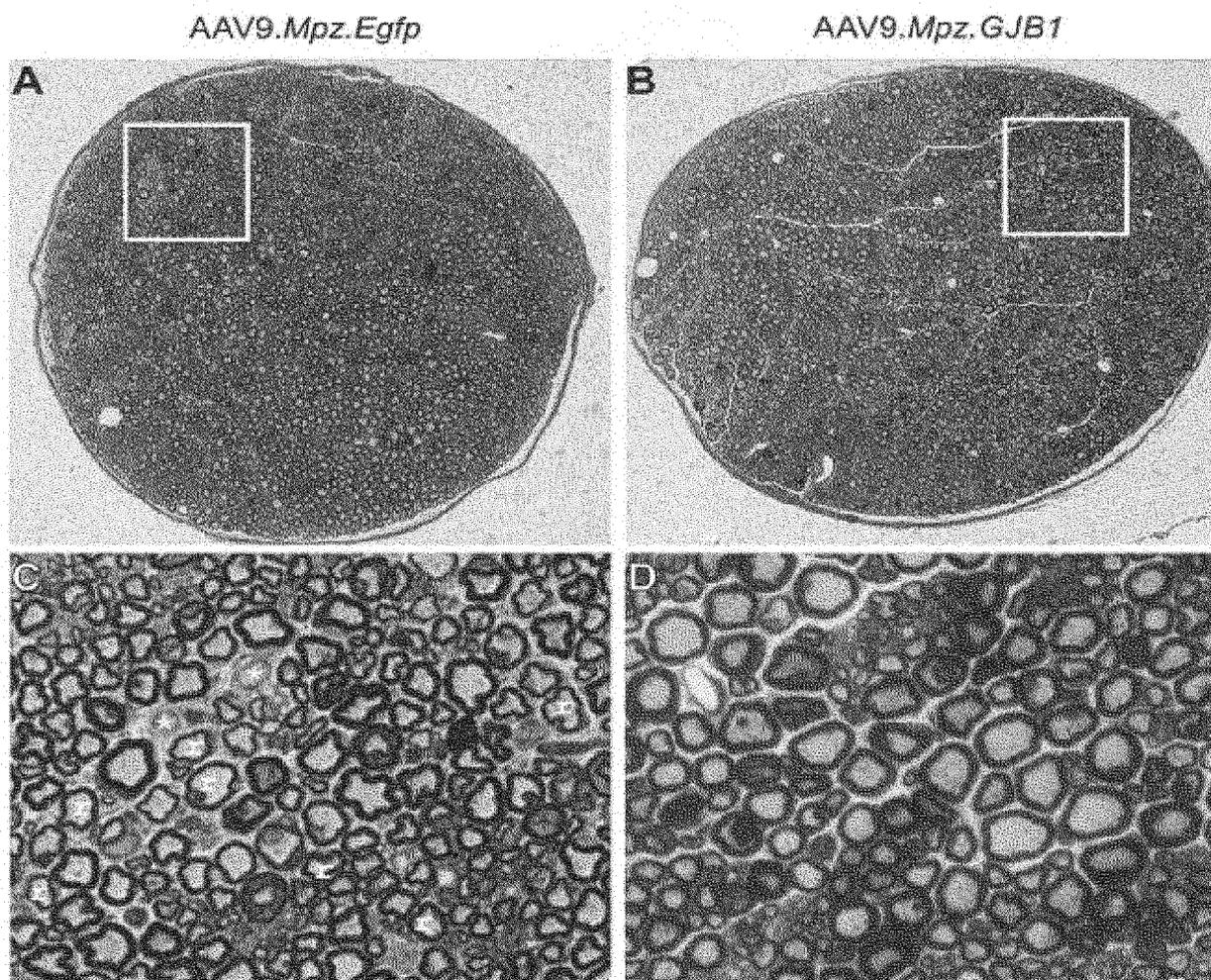
21/26



Фиг. 14
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

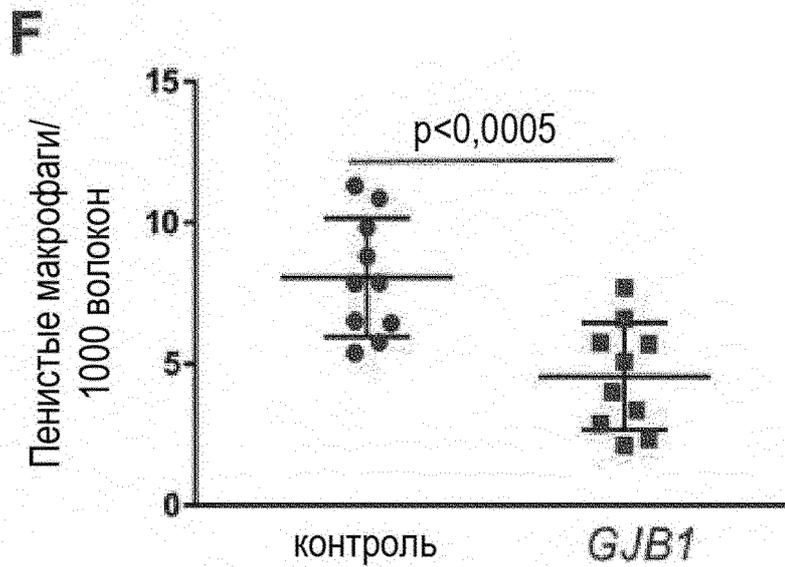
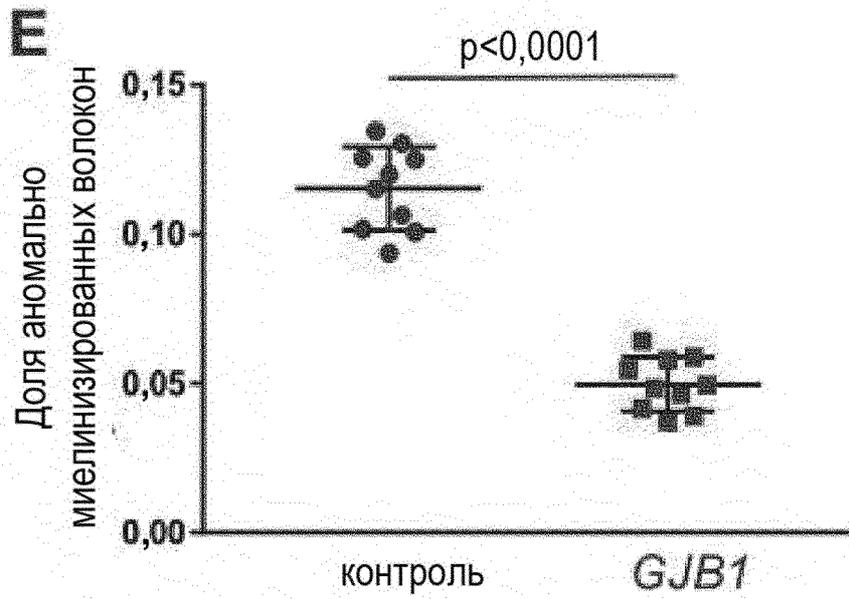
22/26



Фиг. 15
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

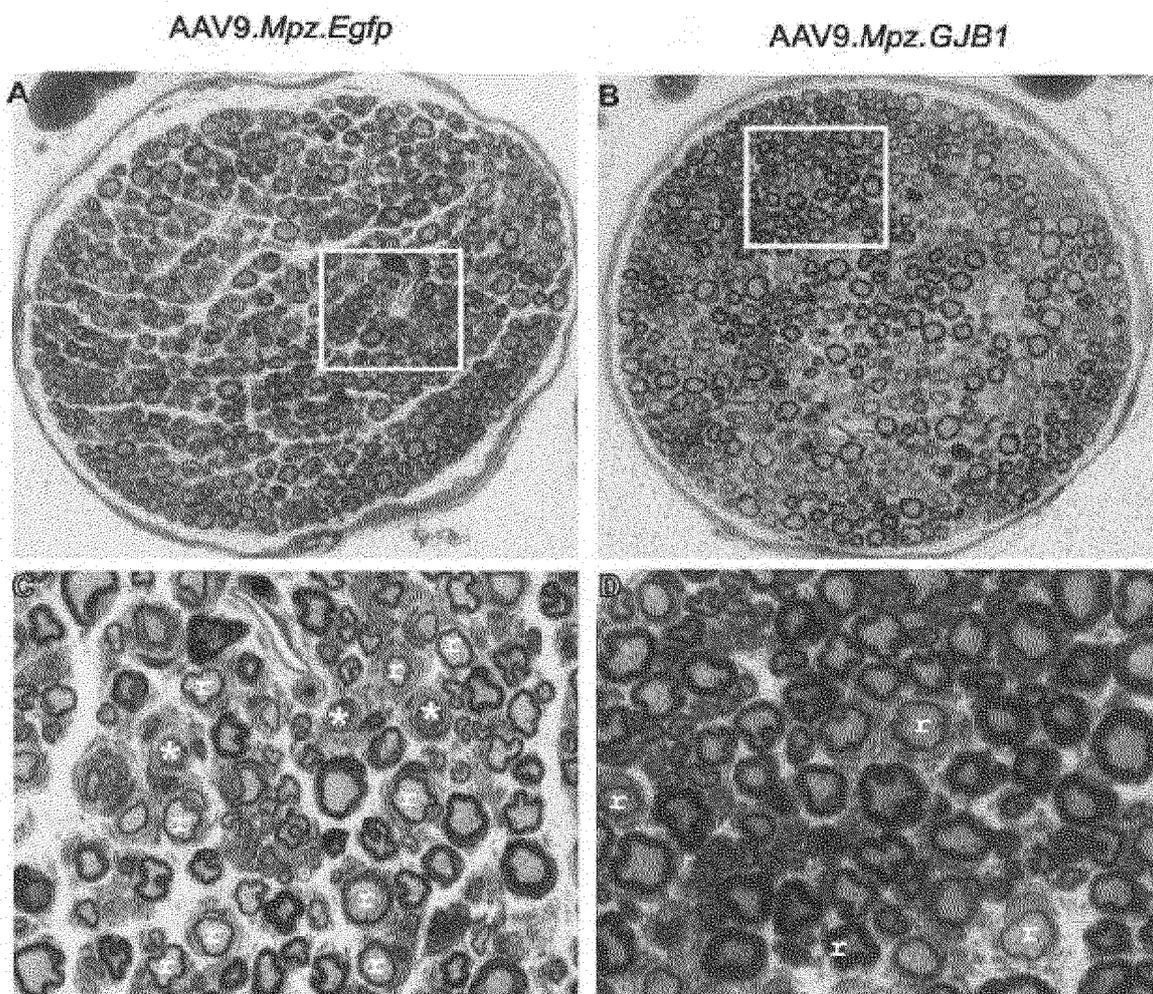
23/26



Фиг. 15
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗНЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

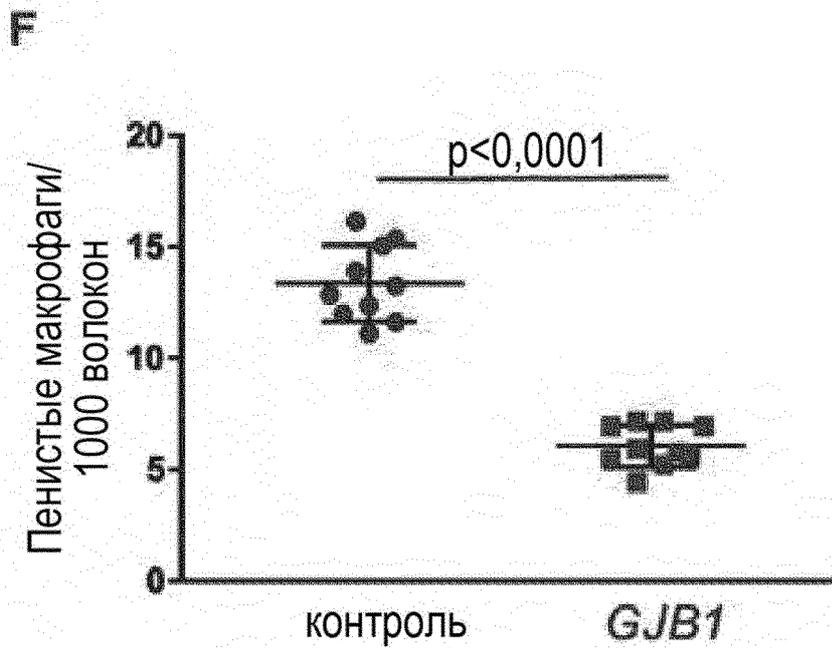
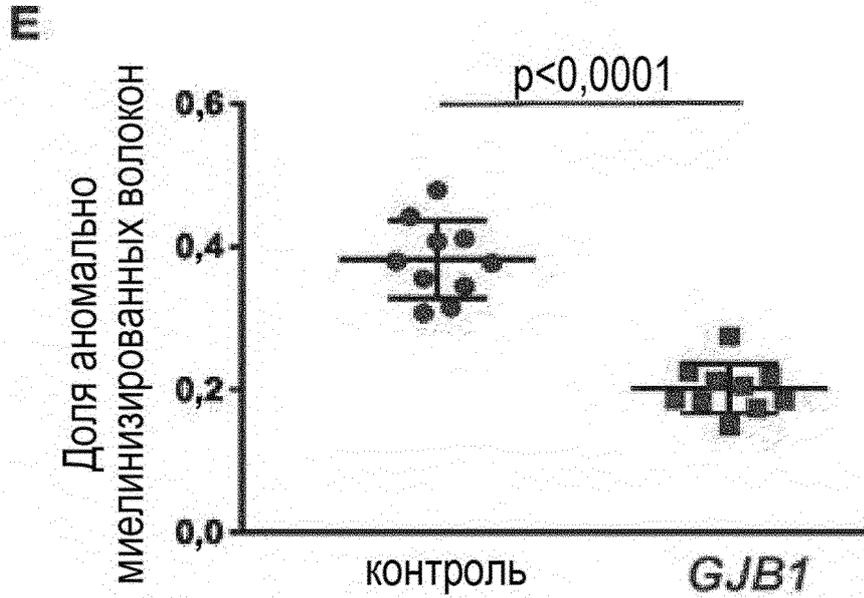
24/26



Фиг. 16
(часть 1 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО –
МАРИ – ТУТА

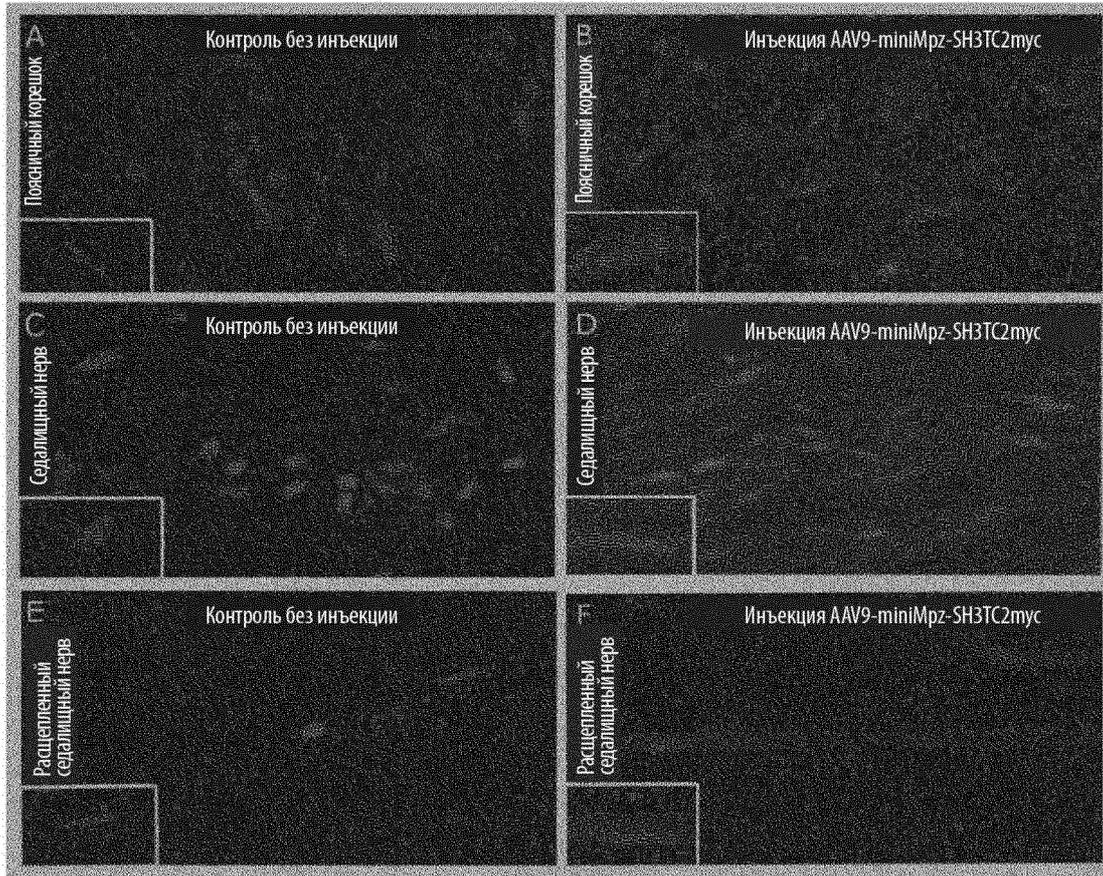
25/26



Фиг. 16
(часть 2 из 2)

ВЕКТОРЫ AAV С ПРОМОТОРОМ МИЕЛИНОВОГО БЕЛКА НОЛЬ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ СО ШВАННОВСКИМИ КЛЕТКАМИ, ТАКИХ КАК БОЛЕЗЬ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

26/26



Фиг. 17