

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291628** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.12.02

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.25

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ**

(31) **62/942,059; 63/004,422**

(32) **2019.11.29; 2020.04.02**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/062394**

(87) **WO 2021/108686 2021.06.03**

(71) Заявитель:
ПАРОС БАЙО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Гэннон Кимберли С., Гуле Мартин,
Хэкетт Нил Р. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к кассетам экспрессии нуклеиновых кислот для лечения нейродегенеративных расстройств. Также предложены способы лечения нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, лобно-височная долевая дегенерация, болезнь Пика, деменция с тельцами Леви, потеря памяти, когнитивные нарушения и легкие когнитивные нарушения.

202291628

A1

A1

202291628

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574428EA/061

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет в соответствии с 35 U.S.C. §119(e) заявки на патент США № 62/942059, поданной 29 ноября 2019 г., и заявки на патент США № 63/004422, поданной 2 апреля 2020 г., полное содержание обеих включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Материал в прилагаемом перечне последовательностей настоящим включен посредством ссылки в данную заявку. Прилагаемый текстовый файл перечня последовательностей с названием APRES1110_2WO_Sequence_Listing.txt был создан 24 ноября 2020 г. и имеет размер 105 КБ. Доступ к файлу можно получить с помощью Microsoft Word на компьютере с ОС Windows.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] Настоящее изобретение в целом относится к генной терапии нейродегенеративных расстройств и, более конкретно, к полинуклеотидам и кассетам экспрессии для доставки терапевтических генов. В конкретных вариантах осуществления терапевтический ген представляет собой пресенилин-1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Болезнь Альцгеймера (БА), также называемая Альцгеймером, представляет собой хроническое нейродегенеративное заболевание, которое является причиной большинства нейродегенеративных деменций. Симптомы включают трудности с памятью, проблемы с речью, дезориентацию, перепады настроения, потерю мотивации и другие поведенческие проблемы, такие как отчуждение от семьи и общества. Функции организма постепенно утрачиваются, что в конечном итоге приводит к смерти. Хотя болезнь может длиться более десяти лет, средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет от трех до девяти лет.

[5] Заболевание сопровождается множеством нейropатологических признаков, основными из которых являются наличие в головном мозге амилоидных бляшек и нейрофибриллярная дегенерация нейронов. Этиология этого заболевания сложна, хотя примерно в 10% случаев БА оно оказывается семейным, наследуемым по аутосомно-доминантному типу. Среди этих наследственных форм БА есть по меньшей мере четыре различных гена, некоторые из мутантов которых придают наследственную предрасположенность к этому заболеванию. Аллельный полиморфизм $\epsilon 4$ (Cys112Arg) гена аполипопротеина E (ApoE) ассоциирован с БА в значительной части случаев с началом в позднем возрасте. Очень небольшая доля семейных случаев с началом в возрасте до 65 лет была связана с мутациями в гене белка-предшественника β -амилоида (APP, англ.: amyloid precursor protein) на хромосоме 21. Третий локус, связанный с

большой долей случаев раннего начала БА, недавно был картирован на хромосоме 14q24.3. Большинство (70-80%) наследственных, ранних стадий БА картируется на хромосоме 14 и, по-видимому, является результатом одной из более чем 20 различных аминокислотных замен в белке пресенилине-1 (PS1). Сходный, хотя и менее распространенный, локус риска БА на хромосоме 1 кодирует белок пресенилин-2 (PS-2, высоко гомологичный PS-1).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Настоящее изобретение относится к кассетам экспрессии полинуклеотидов и нуклеиновых кислот, кодирующим пресенилин-1 (PSEN-1), для лечения нейродегенеративных расстройств.

[7] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК, которая кодирует природную аминокислотную последовательность человеческого пресенилина-1, указанную либо в SEQ ID NO: 12 (изоформа X1), либо в SEQ ID NO: 14 (изоформа X2), при этом по сравнению с кДНК, соответствующей встречающейся в природе последовательности, кодирующей изоформу PSEN-1 X1 (SEQ ID NO: 15), или последовательностью, кодирующей изоформу PSEN-1 X2 (SEQ ID NO: 13), выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 25% толерантных кодонов. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления нетолерантные кодоны не изменены в кодирующей последовательности PSEN-1 в выделенной кДНК или гибридной геномной/кДНК. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 40%, по меньшей мере в 50%, по меньшей мере в 60%, по меньшей мере в 70%, по меньшей мере в 80%, по меньшей мере в 85%, по меньшей мере в 90%, по меньшей мере в 95%, по меньшей мере в 97%, по меньшей мере в 98%, по меньшей мере в 99% толерантных кодонов или во всех толерантных кодонах в кодирующей последовательности PSEN-1.

[8] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК, которая кодирует природную аминокислотную последовательность человеческого пресенилина-1, указанную либо в SEQ ID NO: 12 (изоформа X1), либо в SEQ ID NO: 14 (изоформа X2), при этом выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит 20 или менее динуклеотидов CpG. Это сокращение по сравнению с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, каждая из которых содержит 23 динуклеотида CpG в открытой рамке считывания PSEN1. Следует понимать, что в этих вариантах осуществления замена любого динуклеотида CpG, присутствующего в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, должна быть достигнута путем замены либо цитозина, либо гуанина (или обоих) другим нуклеотидом, который из-за вырожденности генетического кода не изменяет аминокислоту, кодируемую кодоном, содержащим замененный нуклеотид. Другими словами, любая нуклеотидная замена, используемая для удаления динуклеотида CpG, должна сохранять аминокислотную последовательность,

кодируемую SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит менее 15, менее 12, менее 10, менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, один или ни одного из динуклеотидов CpG, присутствующих в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления все нетолерантные кодоны, присутствующие в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, сохраняются в выделенной кДНК или искусственном гене, который имеет уменьшенное количество динуклеотидов CpG.

[9] В некоторых вариантах осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 25% толерантных кодонов, присутствующих в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, и содержит 20 или менее динуклеотидов CpG. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 40%, по меньшей мере в 50%, по меньшей мере в 60%, по меньшей мере в 70%, по меньшей мере в 80%, по меньшей мере в 85%, по меньшей мере в 90%, по меньшей мере в 95%, по меньшей мере в 97%, по меньшей мере в 98%, по меньшей мере в 99% толерантных кодонов или во всех толерантных кодонах в кодирующей последовательности PSEN-1. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК содержит менее 15, менее 12, менее 10, менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, один или ни одного динуклеотида CpG. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления все нетолерантные кодоны, присутствующие в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13, сохраняются в выделенной кДНК или искусственном гене, который имеет уменьшенное количество динуклеотидов CpG.

[10] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена гибридная геномная/кДНК, которая содержит: 1) по меньшей мере часть или весь встречающийся в природе экзон 3 PSEN-1 с двумя донорными сайтами альтернативного сплайсинга, которые используются для получения кДНК в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO: 13; 2) по меньшей мере часть встречающегося в природе интрона 3 PSEN-1, при этом часть интрона 3 содержит акцепторный сайт сплайсинга; и 3) нуклеотидную последовательность, способную кодировать при экспрессии как SEQ ID NO: 12 (изоформа X1), так и SEQ ID NO: 14 (изоформа X2) благодаря использованию донорных сайтов альтернативного сплайсинга, при этом гибридная геномная/кДНК: а) включает менее 70% встречающегося в природе интрона 3 PSEN-1; б) включает менее 70% встречающегося в природе интрона 4 PSEN-1; с) не содержит по меньшей мере один из встречающихся в природе интронов 5, 6, 7, 8 или 9 PSEN-1; и/или d) имеет длину менее 4,4 т.п.н. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления часть гибридной геномной/кДНК, которая кодирует встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человеческого пресенилина-1, указанную в SEQ ID NO: 12 (изоформа X1) или SEQ ID NO:14 (изоформа X2), содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 25% толерантных кодонов, при этом по сравнению с кДНК, соответствующей

встречающейся в природе кодирующей последовательности изоформы X1 PSEN-1 (SEQ ID NO:15) или последовательности изоформы X2 PSEN-1 (SEQ ID NO:13). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления гибридная геномная/кДНК, которая кодирует встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человеческого пресенилина-1, указанную либо в SEQ ID NO: 12 (изоформа X1), либо в SEQ ID NO: 14 (изоформа X2), содержит менее 50 динуклеотидов CpG по всей нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления гибридная геномная/кДНК содержит менее 20 динуклеотидов CpG в кодирующей последовательности PSEN-1. В некоторых вариантах осуществления гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 30% толерантных кодонов в SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:13; менее 50 динуклеотидов CpG по всей нуклеотидной последовательности; менее 20 динуклеотидов CpG в кодирующей последовательности PSEN-1; и никаких изменений в нетолерантных кодонах в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:13. В некоторых более конкретных версиях любого из аспектов, изложенных в этом абзаце, гибридная геномная/кДНК содержит менее 40, менее 30, менее 20, менее 15, менее 12, менее 10, менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, один или ни одного динуклеотида CpG по всей нуклеотидной последовательности. В некоторых более конкретных версиях любого из аспектов, изложенных в этом абзаце, гибридная геномная/кДНК содержит менее 15, менее 12, менее 10, менее 9, менее 8, менее 7, менее 6, менее 5, менее 4, менее 3, один или ни одного динуклеотида CpG в кодирующей области PSEN-1. В некоторых более конкретных версиях любого из аспектов, изложенных в этом абзаце, гибридная геномная/кДНК содержит изменения по оптимизации кодонов по меньшей мере в 40%, по меньшей мере в 50%, по меньшей мере в 60%, по меньшей мере в 70%, по меньшей мере в 80%, по меньшей мере в 85%, по меньшей мере в 90%, по меньшей мере в 95%, по меньшей мере в 97%, по меньшей мере в 98%, по меньшей мере в 99% толерантных кодонов или во всех толерантных кодонах в кодирующей последовательности PSEN-1 в SEQ ID NO:15 или SEQ ID NO:13.

[11] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны выделенные полинуклеотиды, представленные в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, или полинуклеотиды, имеющие по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК представляет собой SEQ ID NO:6 (кДНК), SEQ ID NO:7 (кДНК) или SEQ ID NO:8 (гибридная геномная/кДНК), или полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, и кодирующий ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, соответственно. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, и кодирующий ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, соответственно, сохраняет присутствующие в них нетолерантные кодоны и либо (1) сохраняет все присутствующие в

них оптимизированные кодоны; или (2) заменяет один или более оптимизированных кодонов на другие кодоны, которые кодируют ту же аминокислоту и также являются оптимизированными.

[12] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны выделенные полинуклеотиды, представленные в SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39; или полинуклеотиды, имеющие по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, и кодирующие ту же аминокислотную последовательность, что и каждая из SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 и SEQ ID NO:39. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления полинуклеотид, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 и SEQ ID NO:39, сохраняет присутствующие в них нетолерантные кодоны и либо (1) сохраняет все присутствующие в них оптимизированные кодоны; или (2) заменяет один или более оптимизированных кодонов на другие кодоны, которые кодируют ту же аминокислоту и также являются оптимизированными. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой SEQ ID NO:36. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой SEQ ID NO:37. В альтернативных аспектах этого варианта осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой SEQ ID NO:38. В альтернативных аспектах этого варианта осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой SEQ ID NO:39.

[13] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, содержащих любой из полинуклеотидов кДНК или гибридных геномных/кДНК, кодирующих пресенилин-1, как указано выше.

[14] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит последовательности, кодирующие последовательность 5' инвертированного концевой повтора (ITR) AAV, промотор с необязательным энхансером, полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1, и 3' ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит полноразмерный 5' инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и полноразмерный 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит укороченную версию 5'-ITR, называемую Δ ITR, в которой D-последовательность и сайт концевой разрешения (trs, англ.: terminal resolution site) удалены (X. S. Wang, et al., J Mol Biol 250:573-580, 1995; X. S. Wang, et al., J Virol 70:1668-1677, 1996); C. Ling et al., J Virol. Jan 2015, 89 (2) 952-961; DOI: 10.1128/JVI.02581-14). В некоторых вариантах осуществления ITR выбирают из источника, который отличается от источника капсида AAV. Например, ITR AAV2 могут быть выбраны для использования с капсидом AAV, имеющим особую эффективность в отношении выбранного клеточного рецептора, ткани-мишени или вирусной мишени. В некоторых вариантах осуществления

капсид AAV получен из AAV9. В одном варианте осуществления последовательности ITR из AAV2 или его удаленной версии (Δ ITR), тем не менее, могут быть выбраны ITR из других источников AAV. Если источником ITR является один серотип AAV, а капсид AAV получен из другого серотипа AAV, полученный вектор можно назвать псевдотипированным. В некоторых вариантах осуществления ITR и капсиды получены из AAV9. В некоторых вариантах осуществления ITR получены из одноцепочечных или самокомплементарных векторов AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR могут быть частью кассеты экспрессии, тогда как в альтернативных вариантах осуществления ITR могут быть частью вектора, в который клонирована кассета экспрессии.

[15] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат сигнал инициации трансляции Kozak, такой как полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5.

[16] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат последовательность инсулятора хроматина, такую как полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидная последовательность, имеющая по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4.

[17] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат промотор. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления промотор представляет собой нейрон-специфический промотор. Нейрон-специфический промотор может содержать (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:3; (iii) функциональный фрагмент SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; или (iv) полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный (i), (ii) или (iii). В альтернативных аспектах этих вариантов осуществления промотор выбран из CAG (SEQ ID NO: 23), CBA (SEQ ID NO: 24), UBC (SEQ ID NO: 25), PGK (SEQ ID NO: 26), PKC, EF1a (SEQ ID NO: 27), GUSB, ЦМВ (SEQ ID NO: 28), NSE (SEQ ID NO: 29), PDGF, десмин, MCK, MeCP2 (SEQ ID NO: 30), GFAP (SEQ ID NO: 31), CaMKII или MBP.

[18] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат по меньшей мере один элемент стабильности мРНК. По меньшей мере один элемент стабильности мРНК может содержать (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11; (ii) функциональный вариант SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii). В некоторых аспектах этих вариантов осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит элемент стабильности мРНК, расположенный на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1; и элемент стабильности мРНК, расположенный 3'-конце сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит один или более энхансерных элементов полиаденилирования, таких как, например, сигнальные последовательности полиаденилирования гормона роста человека (hGH), сигнальные последовательности

полиаденилирования бета-глобина кролика (rBG), сигнальные последовательности полиаденилирования SV40 или сигнальные последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH).

[19] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат один, два или три сайта связывания микроРНК («микроРНК» или «микроР») для подавления экспрессии кодируемого PSEN-1 в дорсальных корешковых ганглиях. МикроРНК представляют собой некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с сайтами связывания микроРНК и подавляют экспрессию генов либо за счет снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо за счет ингибирования трансляции. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления каждый сайт связывания микроРНК независимо выбран из сайта связывания любой из следующих микроРНК: микроРНК-1914, микроР1181, микроР3918, микроР939, микроР324, микроР650, микроР29С или микроР2277. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления сайт(ы) связывания микроРНК расположен(ы) на 3'-конце кодирующей последовательности вирусного генома.

[20] В других вариантах осуществления предложены векторы, содержащие кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, представленные в настоящем документе. Вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как вектор аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор. Вектор AAV может представлять собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVDJ, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV2/1, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/rh10, AAV2/11 или AAV2/12.

[21] Вектор, как описано в данном документе, может представлять собой псевдотипированный вектор. Псевдотипирование обеспечивает механизм для модулирования популяции клеток-мишеней вектора. Псевдотипированные векторы содержат геном одного вектора, например, геном одного серотипа AAV, в капсиде второго вектора, например, второго серотипа AAV. Лентивирусный вектор может быть псевдотипирован с помощью гликопротеинов оболочки, полученных из серотипов вируса везикулярного стоматита (VSV) рабдовируса (штаммы Indiana и Chandipura), вируса бешенства (например, различных штаммов ERA Evelyn-Rokitnicki-Abelseth и стандартного контрольного вируса (CVS)), вируса Лиссавирус Мокола, родственного бешенству вируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса Мокола (MV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), гликопротеина вируса бешенства (RV-G), гликопротеина типа В (FuG-B), варианта FuG -B (FuG-B2) или вируса мышинового лейкоза Молони (MuLV). Вирус может быть псевдотипирован для трансдукции одного или более нейронов или групп клеток.

[22] В других вариантах осуществления предложены кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, содержащие: (i) любой из полинуклеотидов кДНК или гибридных геномных/кДНК, кодирующих пресенилин-1, как указано выше; (ii) сигнал инициации

трансляции Kozak; (iii) нейрон-специфический промотор; (iv) последовательность инсулятора хроматина; (v) по меньшей мере один элемент стабильности мРНК; или (v) любую их комбинацию. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления кассеты экспрессии нуклеиновых кислот содержат каждый из: (i) любого из полинуклеотидов кДНК или гибридных геномных/кДНК, кодирующих пресенилин-1, как указано выше; (ii) сигнала инициации трансляции Kozak; (iii) нейрон-специфического промотора; (iv) последовательности инсулятора хроматина и (v) по меньшей мере один элемент стабильности мРНК. В более конкретных аспектах этих вариантов осуществления сигнал инициации трансляции Kozak содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:5; последовательность инсулятора хроматина содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4; по меньшей мере один элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или любую их комбинацию; и нейрон-специфический промотор содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

[23] В настоящем документе описаны способы лечения нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, кассеты экспрессии или вектора нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, заднюю кортикальную атрофию (ЗКА), логопеническую прогрессирующую афазию (lvPPA, англ.: logopenic progressive aphasia), БА с сохранением гиппокампа, лобно-височную деменцию, лобно-височную долевую дегенерацию, болезнь Пика, деменцию с тельцами Леви, афазические варианты БА, поведенчески-компортментальный («лобный») вариант БА, дизэкзективный вариант, потерю памяти, когнитивные нарушения или легкие когнитивные нарушения.

[24] В настоящем документе описаны способы получения белка пресенилина-1, включающие трансформацию клетки-хозяина оптимизированным полинуклеотидом, представленным в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39; или полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, и кодирующим тот же полипептид, который кодируется каждым из вышеперечисленных, или вектором, кодирующим полинуклеотид, оптимизированным для пресенилина-1; и культивирование клетки в условиях и в течение времени, которые обеспечивают экспрессию белка пресенилина-1. В некоторых аспектах уровень экспрессии белка пресенилина-1, кодируемого оптимизированным полинуклеотидом, в клетке-хозяине превышает уровень экспрессии белка пресенилина-1, кодируемого полинуклеотидом дикого типа, в клетке-хозяине, в результате чего образуется белок пресенилин-1.

[25] Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть объединены для формирования других вариантов осуществления настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[26] **Фигура 1** представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую количество белка пресенилина-1, экспрессированного клетками НЕК293, содержащими конструкции, содержащие различные кодон-оптимизированные версии кодирующей последовательности пресенилина-1 под контролем промотора ЦМВ, а также из кодирующей последовательности пресенилина-1 дикого типа. Звездочка «*» указывает на статистически значимое различие ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественных сравнений Тьюки).

[27] **Фигура 2** представляет собой гистограмму, показывающую количество белка пресенилина-1, экспрессируемого клетками НЕК293, содержащими конструкции, содержащие различные кодон-оптимизированные версии последовательности, кодирующей пресенилин-1, экспрессия которых управляется промотором CAG (CAG-v1.5, содержащий кодирующую PSEN1 последовательность SEQ ID NO:37; CAG v3.0, содержащий кодирующую PSEN1 последовательность SEQ ID NO:39)), а также кодирующую последовательность пресенилина-1 дикого типа (SEQ ID NO:15), управляемую промотором CAG. Звездочка «*» указывает на статистически значимое различие по сравнению с пресенилином-1 дикого типа ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественных сравнений Тьюки).

[28] **Фигура 3** представляет собой гистограмму, показывающую активность гамма-секретазы, измеренную путем расщепления NotchΔE до NICD в фибробластах пациентов с семейной болезнью Альцгеймера (СБА), несущих мутацию С410Y или G206A в PSEN1. Фибробласты трансформировали пустым вектором («NotchΔE+пустой») или вектором, содержащим SEQ ID NO:37, кодирующим PSEN1 («NotchΔE+hPSENv1.5»), в присутствии или в отсутствие ингибитора гамма-секретазы DAPT, и измеряли уровни NICD. Звездочки «**» указывают на статистически значимое различие по сравнению с пустым вектором ($p < 0,01$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественных сравнений Тьюки).

[29] **Фигура 4** представляет собой гистограмму, показывающую уровень продукции Аβ40 в фибробластах пациентов с семейной болезнью Альцгеймера (СБА), несущих мутацию С410Y в PSEN1 (С410Y), после трансформации либо пустым вектором («пустой»), либо вектором, содержащим SEQ ID. NO:37, кодирующую PSEN1 («pAT028»).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[30] Настоящее изобретение основано на фундаментальном открытии того, что оптимизированные полинуклеотиды и кассеты экспрессии, кодирующие оптимизированные терапевтические гены, такие как пресенилин-1, могут быть использованы для повышения уровней экспрессии терапевтического гена по сравнению с последовательностью дикого типа для доставки генной терапии для применения в лечении нейродегенеративных расстройств.

[31] Перед описанием настоящих композиций и способов следует понимать, что

данное изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями, способами и экспериментальными условиями, поскольку такие композиции, способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[32] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Определения

[33] Если специально не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, следует понимать в том значении, которое обычно понимает специалист в данной области техники (например, в области клеточных культур, молекулярной генетики и биохимии). Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании изобретения, следует понимать, что модификации и варианты охватываются сущностью и объемом настоящего изобретения. Ниже описаны предпочтительные способы и материалы.

[34] Используемый в данном документе термин «приблизительно» в контексте числового значения или диапазона означает $\pm 10\%$ от числового значения или диапазона, указанного или заявленного, если контекст не требует более ограниченного диапазона. Кроме того, термин «приблизительно», когда он используется в связи с одним или несколькими числами или числовыми диапазонами, следует понимать как относящийся ко всем таким числам, включая все числа в диапазоне, и изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. Указание числовых диапазонов по конечным точкам включает все числа, например, целые значения числа, включая его дробные значения, входящие в этот диапазон (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4 и 5, а также их дробные значения, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и т.п.) и любой диапазон в пределах этого диапазона.

[35] В контексте настоящего документа формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включая», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты применяются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для включения, аналогично термину «содержащий». Следует отметить, что в рамках настоящего документа и формулы изобретения использование формы единственного числа включает объекты во множественном числе, если из контекста не следует иное. Таким образом, ссылка на «белок» представляет собой ссылку на один или несколько белков и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

[36] Используемые в данном документе термины «содержащий», «содержать» или «содержит» и их варианты в отношении определенных или описанных элементов изделия, композиции, устройства, способа, процесса, системы и т. д. считаются включающими или открытыми, допускающими дополнительные элементы, тем самым указывая, что определенное или описанное изделие, композиция, устройство, способ, процесс, система и т. д. включают в себя указанные элементы или, в соответствующих случаях, их эквиваленты, и что другие элементы могут быть включены и по-прежнему подпадают под объем/определение определенного изделия, композиции, устройства, способа, процесса, системы и т. д.

[37] Под «вектором AAV» подразумевается вектор, полученный из серотипа аденоассоциированного вируса, включая без ограничения AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6 и т. д. Векторы AAV могут иметь один или более генов AAV дикого типа, делетированных полностью или частично, предпочтительно гены *her* и/или *cap*, но сохраняют функциональные фланкирующие последовательности ITR. Функциональные последовательности ITR необходимы для восстановления, репликации и упаковки вириона AAV. Таким образом, вектор AAV определен в данном документе как включающий по меньшей мере те последовательности, которые необходимы в *cis*-положении для репликации и упаковки (например, функциональные ITR) вируса. ITR не обязательно должны быть нуклеотидными последовательностями дикого типа, и они могут быть изменены, например, путем вставки, делеции или замены нуклеотидов, при условии, что последовательности обеспечивают функциональное восстановление, репликацию и упаковку.

[38] Элементы управления выбраны так, чтобы они были функциональными в клетке млекопитающего. Полученная конструкция, которая содержит функционально связанные компоненты, связана (5' и 3') с функциональными последовательностями ITR AAV. Под «инвертированными концевыми повторами аденоассоциированного вируса» или «ITR AAV» подразумевают признанные в данной области техники, обнаруженные на каждом конце генома AAV, которые функционируют вместе в *cis*-положении в качестве точек начала репликации ДНК и в качестве сигналов упаковки для вируса. ITR AAV вместе с кодирующей областью *her* AAV обеспечивают эффективное вырезание, удаление и интеграцию нуклеотидной последовательности, расположенной между двумя фланкирующими ITR, в геном клетки млекопитающего. Нуклеотидные последовательности областей ITR AAV известны. Используемый в данном документе термин «ITR AAV» не обязательно включает нуклеотидную последовательность дикого типа, но может быть изменен, например, путем вставки, делеции или замены нуклеотидов. Кроме того, ITR AAV может быть получено из любого из нескольких серотипов AAV, включая, помимо прочего, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6 и т. д. Кроме того, 5' и 3' ITR, которые фланкируют выбранную нуклеотидную последовательность в векторе AAV, не обязательно должны быть идентичными или получены из того же серотипа или изолята AAV, при условии, что они функционируют должным образом, т. е.

обеспечивают вырезание и восстановление представляющей интерес последовательности из генома клетки-хозяина или вектора, а также обеспечивают интеграцию гетерологичной последовательности в геном клетки-реципиента, когда продукты гена Rep AAV присутствуют в клетке. Кроме того, ITR AAV могут быть получены из любого из нескольких серотипов AAV, включая, помимо прочего, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV 5, AAV6 и т. д. Кроме того, 5' и 3' ITR, которые фланкируют выбранную нуклеотидную последовательность в векторе экспрессии AAV, не обязательно должны быть идентичными или получены из того же серотипа или изолята AAV, при условии, что они функционируют должным образом, т. е. обеспечивают вырезание и восстановление представляющей интерес последовательности из генома клетки-хозяина или вектора, а также обеспечивают интеграцию молекулы ДНК в геном клетки-реципиента, когда продукты гена Rep AAV присутствуют в клетке.

[39] Термины «дикий тип» и «нативный» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к форме вещества (например, полинуклеотиду, последовательности нуклеотидов, белку и т. д.), которая встречается в природе. Термин «кодирующая последовательность пресенилина-1 дикого типа», используемый в данном документе, означает полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15.

[40] Термин «гибридная геномная/кДНК», используемый в данном документе, означает не встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок (например, человеческий пресенилин-1), где кодирующая последовательность белка прерывается одним или более некодирующими интронными последовательностями.

[41] Термин «нетолерантный кодон», используемый в данном документе, означает кодон, присутствующий в эталонной нуклеотидной последовательности, который не изменен в соответствующей рассматриваемой нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же аминокислотную последовательность. Нетолерантные кодоны в SEQ ID NO: 15 подчеркнуты.

[42] Термин «толерантный кодон», используемый в данном документе, означает кодон, присутствующий в эталонной нуклеотидной последовательности, который не является нетолерантным кодоном. Толерантный кодон может быть заменен другим кодоном, кодирующим ту же аминокислоту в соответствующей нуклеотидной последовательности субъекта, кодирующей ту же аминокислотную последовательность.

[43] Термин «оптимизированный кодон» означает кодон, указанный в Таблице 2 или Таблице 3. Кодон в рассматриваемой нуклеотидной последовательности считается «оптимизированным», когда соответствующий кодон в эталонной последовательности заменяется другим кодоном, кодирующим ту же аминокислоту и выбранным из кодона, представленного в Таблице 1 или Таблице 2.

[44] Термин «изменение по оптимизация кодона» означает замену толерантного кодона в эталонной последовательности кодоном, кодирующим ту же аминокислоту,

выбранную из Таблицы 2. Для некоторых аминокислот существует более одного оптимизированного кодона (см. Таблицу 2). Для ясности термин «изменения по оптимизации кодонов» включает замену оптимизированного кодона, присутствующего в эталонной последовательности, другим оптимизированным кодоном, кодирующим ту же аминокислоту, что указана в Таблице 1.

[45] Экзоны и интроны гена PSEN1 можно идентифицировать со ссылкой на справочный номер последовательности GenBank NG_007386 следующим образом: Экзон 1 состоит из нуклеотидов с 5037 по 5113; интрон 1 состоит из нуклеотидов с 5114 по 16324; экзон 2 состоит из нуклеотидов с 16325 по 16406; интрон 2 состоит из нуклеотидов с 16407 по 16496; экзон 3 состоит из нуклеотидов с 16497 по 16636; интрон 3 состоит из нуклеотидов с 16637 по 39326; экзон 4 состоит из нуклеотидов с 39327 по 39577; интрон 4 состоит из нуклеотидов с 39578 по 42095; экзон 5 состоит из нуклеотидов с 42096 по 42237; интрон 5 состоит из нуклеотидов с 42238 по 55382; экзон 6 состоит из нуклеотидов с 55383 по 55450; интрон 6 состоит из нуклеотидов с 55451 по 61173; экзон 7 состоит из нуклеотидов с 61174 по 61394; интрон 7 состоит из нуклеотидов с 61395 по 66560; экзон 8 состоит из нуклеотидов с 66561 по 66659; интрон 8 состоит из нуклеотидов с 66660 по 74915; экзон 9 состоит из нуклеотидов с 74916 по 75002; интрон 9 состоит из нуклеотидов с 75003 по 80298; экзон 10 состоит из нуклеотидов с 80299 по 80472; интрон 10 состоит из нуклеотидов с 80473 по 85655; экзон 11 состоит из нуклеотидов с 85656 по 85776; интрон 11 состоит из нуклеотидов с 85775 по 87663; экзон 12 состоит из нуклеотидов с 87664 по 92222.

[46] Термин «динуклеотид CpG» означает любое появление нуклеотидной последовательности CG в эталонной нуклеотидной последовательности.

[47] Термин «самокомплементарный AAV» относится к конструкции, в которой кодирующий участок, переносимый нуклеотидной последовательностью рекомбинантного AAV, был разработан для образования внутримолекулярной матрицы двухцепочечных ДНК. При инфицировании вместо того, чтобы ожидать клеточноопосредованного синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV будут связываться с образованием одной единицы двухцепочечной ДНК (дцДНК), которая готова к немедленной репликации и транскрипции. См., например, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США № 6596535; 7125717 и 7456683, полное описание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[48] Используемые в данном документе термины «функционально связанный», «функциональная связь», «оперативно связанный» или их грамматические эквиваленты относятся к сопоставлению генетических элементов, например, полинуклеотида, кодирующего белок или РНК, промотора, энхансера, последовательности полиаденилирования, и т.д., при этом элементы находятся во взаимосвязи, позволяющей

им работать ожидаемым образом. Например, регуляторный элемент, который может содержать промоторную и/или энхансерную последовательности, функционально связан с кодирующей областью, если регуляторный элемент помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Между регуляторным элементом и кодирующей областью могут быть промежуточные остатки до тех пор, пока сохраняется эта функциональная взаимосвязь.

[49] Как используется в этом описании и прилагаемой формуле изобретения, термин «или» обычно используется в своем значении, включающем «и/или», если контекстом явно не указано иное.

[50] «Процент (%) идентичности» по отношению к эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности определяется как процент нуклеиновых кислот или аминокислот в последовательности-кандидате, которые идентичны нуклеиновым кислотам или аминокислотам в эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области, к примеру, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2 или программного обеспечения Megalign. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. К примеру, значения процентной идентичности последовательностей могут быть получены с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей BLAST. В качестве иллюстрации процент идентичности последовательности данной нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, А, относительно, с или против данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты, В (которая альтернативно может быть сформулирована как данная нуклеиновая кислота или кислотная последовательность, А, которая имеет определенный процент идентичности последовательности с данной нуклеиновой кислотой или аминокислотной последовательностью, с или против данной нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, В) рассчитывается следующим образом:

$100 \text{ умножить на } (\text{дробь } X/Y)$

где X представляет собой количество нуклеотидов или аминокислот, оцененных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательностей (например, BLAST) при выравнивании этой программой А и В, и где Y - общее количество нуклеиновых кислот в В. Если длина нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности А не равна длине нуклеиновой кислоты или аминокислотной

последовательности В, процент идентичности последовательностей А и В не будет равен проценту идентичности последовательностей В и А.

[51] В контексте данного документа термин «экспрессия полинуклеотида или гена» относится к процессу, с помощью которого последовательность нуклеиновой кислоты или полинуклеотид транскрибируется с матрицы ДНК (например, в мРНК или другой транскрипт РНК) и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут совместно называться «полинуклеотидами или генными продуктами». Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. Термины «экспрессия полинуклеотида или гена» и «экспрессия» могут использоваться взаимозаменяемо, если из контекста явно не следует иное.

[52] Используемый в данном документе термин «пресенилин-1» обозначает белок, кодируемый геном PSEN1. Пресенилин-1 является одним из четырех основных белков пресенилинового комплекса, который опосредует регулируемые протеолитические события нескольких белков в клетке, включая гамма-секретазу. Считается, что гамма-секретаза играет важную роль в образовании бета-амилоида, накопление которого связано с началом болезни Альцгеймера, из белка-предшественника бета-амилоида. Существуют две формы пресенилина-1, кодируемые геном PSEN1 на основе альтернативного сплайсинга. Преобладающей формой у человека является изоформа X1, состоящая из 467 аминокислот. Альтернативной формой является изоформа X2, состоящая из 463 аминокислот. Пресенилин-1, пресенилин-2 (PSEN2) и белок-предшественник амилоида (APP) в основном связаны с аутосомно-доминантными формами болезни Альцгеймера с ранним началом.

[53] Используемый в данном документе термин «промотор» определяется как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности. «Конститутивный» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке в большинстве или во всех физиологических условиях клетки. «Индукцибельный» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим генный продукт, вызывает образование генного продукта в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, соответствующий промотору. «Тканеспецифический» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяемым геном, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по существу только в том случае, если клетка является клеткой типа ткани, соответствующего промотору. В качестве альтернативы

можно использовать гетерологичные контрольные последовательности. Полезные гетерологичные контрольные последовательности обычно включают последовательности, полученные из последовательностей, кодирующих гены млекопитающих или вирусы. Примеры включают, помимо прочего, промотор фосфоглицераткиназы (PGK), CAG, нейрональные промоторы, промотор рецептора дофамина-1 и рецептора дофамина-2, ранний промотор SV40, промотор LTR вируса опухоли молочной железы мыши; главный поздний промотор аденовируса (Ad MLP); промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как область непосредственно раннего промотора ЦМВ (CMVIE), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), синтетические промоторы, гибридные промоторы и т.п. Кроме того, в данном документе также найдут применение последовательности, полученные из невирусных генов, таких как ген металлотioneина мыши. Такие промоторные последовательности коммерчески доступны, например, от Stratagene (Сан-Диего, Калифорния). Для целей настоящего изобретения будут особенно полезны как гетерологичные промоторы, так и другие элементы управления, такие как ЦНС-специфические и индуцируемые промоторы, энхансеры и т.п. Примеры гетерологичных промоторов включают промотор ЦМВ. Примеры ЦНС-специфических промоторов включают промоторы, выделенные из генов основного белка миелина (MBP), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и нейрон-специфичной енолазы (NSE).

[54] Используемый в данном документе термин «регуляторный элемент» относится к генетическому элементу или полинуклеотиду, который сам по себе или вместе с одним или более дополнительными регуляторными элементами влияет или модулирует экспрессию полинуклеотида или гена. Регуляторный элемент может способствовать экспрессии полинуклеотида или гена, повышать экспрессию полинуклеотида или гена, снижать экспрессию полинуклеотида или гена и/или обеспечивать селективную экспрессию полинуклеотида или гена в конкретном типе клеток или ткани. Регуляторный элемент может влиять или модулировать экспрессию полинуклеотидов или генов во времени и/или в пространстве. Используемый в данном документе термин «регулировать экспрессию полинуклеотида или гена», «влиять на экспрессию полинуклеотида или гена» или «модулировать экспрессию полинуклеотида или гена» относится к увеличению экспрессии полинуклеотида или гена, снижению экспрессии полинуклеотида или гена и/или приданию селективной экспрессии полинуклеотиду или гену. «Регулирование экспрессии полинуклеотида или гена», «влияние на экспрессию полинуклеотида или гена» или «модулирование экспрессии полинуклеотида или гена» может относиться к временной и/или пространственной регуляции.

[55] «Трансген» используется в данном документе для удобного обозначения полинуклеотида или нуклеиновой кислоты, которые предназначены для введения или были введены в клетку или организм. Трансгены включают любую нуклеиновую кислоту, такую как ген, кодирующий полипептид или белок.

[56] Термин «вариант» при использовании в контексте полинуклеотидной последовательности может охватывать полинуклеотидную последовательность, связанную с геном дикого типа. Это определение может также включать, например, «аллельные», «сплайсированные», «видовые» или «полиморфные» варианты. Вариант сплайсинга может иметь значительную идентичность с эталонной молекулой, но обычно будет иметь большее или меньшее количество полинуклеотидов из-за альтернативного сплайсинга экзонов во время процессинга мРНК. Соответствующий полипептид может иметь дополнительные функциональные домены или не иметь доменов. Видовые варианты представляют собой полинуклеотидные последовательности, которые варьируются от одного вида к другому. Особо полезными в изобретении являются варианты генных продуктов дикого типа. Варианты могут возникать в результате по меньшей мере одной мутации в последовательности нуклеиновой кислоты и могут приводить к измененным мРНК или полипептидам, структура или функция которых могут быть изменены или не изменены. Любой данный природный или рекомбинантный ген может не иметь ни одной, одну или много аллельных форм. Общие мутационные изменения, приводящие к вариантам, обычно приписывают естественным делециям, добавлениям или заменам нуклеотидов. Каждый из этих типов изменений может возникать отдельно или в сочетании с другими, один или более раз в заданной последовательности.

[57] Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающие поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,1, 2,2, 2,7, 3, 4, 5, 5,5, 5,75, 5,8, 5,85, 5,9, 5,95, 5,99 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

[58] В настоящем изобретении предложены композиции и способы лечения субъектов с болезнью Альцгеймера и другими нейродегенеративными заболеваниями, расстройствами и состояниями. В частности, в настоящем изобретении рассматривается генная терапия путем предоставления полинуклеотида, кодирующего ген пресенилина-1 (PSEN1), субъекту, нуждающемуся в лечении. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой нейродегенеративного заболевания головного мозга. Патологические признаки БА включают внутринейрональное накопление парных спиральных филаментов, состоящих из аномальных тау-белков, и внеклеточные накопления β -амилоидного пептида (A β) в нейритных бляшках. Клинически БА можно разделить на два фенотипа в зависимости от возраста начала: БА с ранним началом

(EOAD, англ.: early-onset AD; <65 лет) и БА с поздним началом (LOAD, англ.: late-onset AD; >65 лет), из которых LOAD является более распространенной формой во всем мире. Доля EOAD во всех случаях БА составляет от 5% до 10%. Пресенилин-1 (PSEN1), пресенилин-2 (PSEN2) и белок-предшественник амилоида (APP) в основном связаны с аутосомно-доминантными формами EOAD. Помимо генетических факторов, мутации связаны с окружающей средой. Генетически-средовые взаимодействия могут быть вызваны различиями в возрасте начала заболевания, нейропатологическими паттернами и продолжительностью заболевания.

[59] PSEN1 и PSEN2 кодируют трансмембранные белки PS1 и PS2, соответственно, которые составляют каталитическое ядро γ -секретазы, члена-основателя нового класса нетрадиционных внутримембранных расщепляющих протеаз (I-CLiP). Активная γ -секретаза представляет собой мультибелковый комплекс, состоящий из PS1 или PS2 вместе с никастрином (NCT), предшественником фаринкс-дефектного белка 1 (APH1) и энхансером пресенилина-2 (PEN2). Экспериментальные данные, такие как связывание аналогов переходного состояния ингибиторов γ -секретазы с PS1, а также отмена активности γ -секретазы, когда в PS1 отсутствуют остатки аспартата, важные для протеолиза, подтвердили, что пресенилины содержат активный сайт ферментативного комплекса.

[60] PS1 и PS2 играют фундаментальную роль в передаче клеточных сигналов как часть комплекса γ -секретазы. Последний расщепляет многочисленные мембранные белки типа I в их трансмембранном домене, высвобождая соответствующие им внутриклеточные домены, которые способны влиять на экспрессию генов. Белок-предшественник амилоида (APP) подвергается последовательному действию β -секретазы (BACE1) и γ -секретазы, образуя амилоид-бета-пептиды (A β) различной длины, включающие от 37 до 46 аминокислот. Расщепление C-концевых фрагментов APP (APP-CTF) с помощью γ -секретазы также высвобождает внутриклеточный домен APP (AICD), который недавно был вовлечен в регуляцию экспрессии ApoE в головном мозге, основной генетической детерминанты БА и метаболизм холестерина. Кроме того, было показано, что PS1 взаимодействует с растущим списком белков, которые модулируют активность γ -секретазы.

[61] **Композиции нуклеиновых кислот**

[62] Соответственно, в настоящем изобретении предложена выделенная кДНК или гибридная геномная/кДНК, которая кодирует встречающийся в природе пресенилин-1 человека и характеризуется одним или более из следующих признаков: оптимизация кодонов только в некоторых или всех толерантных кодонах, снижение динуклеотидов CpG или присутствие донорно-акцепторных сайтов сплайсинга для обеспечения экспрессии обеих изоформ PSEN-1; кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, содержащие вышеуказанные и дополнительные регуляторные элементы; векторы, содержащие такие кассеты экспрессии; композиции, содержащие эти векторы; и способы генной терапии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, в которых

используется любое из вышеперечисленных. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, будут приводить к повышенной и улучшенной экспрессии PSEN-1 по сравнению с нативными или мутированными формами PSEN-1 у пациентов, нуждающихся в этом, например, пациенты с болезнью Альцгеймера. Таким образом, экспрессия белка PSEN-1 может быть увеличена при более низкой дозе кассеты экспрессии или вектора, содержащего эту кассету экспрессии.

[63] В одном варианте осуществления предложены кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, содержащие любой из полинуклеотидов кДНК или гибридных геномных/кДНК, кодирующих пресенилин-1, как указано выше; и один или более регуляторных элементов, функционально связанных с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин-1.

[64] Любой генетический элемент, который модулирует или влияет на экспрессию полинуклеотидов или генов, может быть регуляторным элементом, включая, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы хроматина, последовательности инициации трансляции, такие как сильные и слабые сигнальные последовательности Kozak и внутренние сайты связывания рибосом, последовательности стабильности мРНК, последовательности, влияющие на процессинг мРНК, такие как сплайсинг и расщепление, последовательности, влияющие на экспорт мРНК из ядра и/или удержание мРНК, элементы посттрансляционного ответа, некодирующие последовательности, такие как интроны, последовательности поли-А, репрессоры, сайленсеры, терминаторы и другие. Регуляторные элементы могут модулировать экспрессию полинуклеотидов или генов на уровне транскрипции, на посттранскрипционном уровне, на уровне трансляции или любой их комбинации. Регуляторные элементы могут повышать скорость образования РНК-транскриптов, повышать стабильность продуцируемой РНК, повышать скорость синтеза белка из РНК-транскриптов, предотвращать деградацию РНК и/или повышать стабильность РНК, например, для облегчения синтеза белка.

[65] Кассета экспрессии, используемая в настоящем документе, может подходящим образом содержать промотор и последовательность поли-А. В некоторых предпочтительных вариантах кассета экспрессии может содержать промотор, последовательность поли-А и элемент стабильности мРНК. Особенно предпочтительная кассета экспрессии может включать промотор CAG, Kozak, кодон-оптимизированный PSEN1 (только толерантный), элемент стабильности мРНК и поли-А. Особенно предпочтительная кассета экспрессии может включать SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SED ID NO:9 и SEQ ID NO:34. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные векторы могут содержать AAV, окруженный ITR и упакованный в капсид AAV9 или AAVrh10.

[66] Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут содержать регуляторные элементы, которые регулируют или модулируют экспрессию полинуклеотидов или генов на любой стадии, включая, например, уровни

транскрипции, посттранскрипции и трансляции. Регуляторный элемент может регулировать или модулировать экспрессию полинуклеотида или гена более чем на одном уровне или функционировать более чем одним способом, регулирующим или модулирующим экспрессию полинуклеотида или гена. Таким образом, регуляторный элемент может иметь любую функцию или любое сочетание функций, описанных выше. Например, регуляторный элемент может функционировать как элемент, стабилизирующий мРНК, и модулировать, то есть увеличивать или уменьшать трансляцию. В качестве еще одного примера регуляторный элемент может модулировать инициацию транскрипции и модулировать стабильность мРНК. Регуляторный элемент также может иметь преобладающую функцию, посредством которой он модулирует экспрессию полинуклеотида или гена, и иметь одну или более дополнительных функций, которые увеличивают или уменьшают экспрессию полинуклеотида или гена. Регуляторный элемент может содержать последовательность, расположенную внутри или перекрывающуюся с другими регуляторными элементами, которые имеют такие же или разные функции в модулировании экспрессии полинуклеотида или гена или которые модулируют экспрессию полинуклеотида или гена на тех же или других этапах.

[67] Регуляторные элементы могут быть получены из кодирующих или некодирующих последовательностей ДНК. Регуляторные элементы, полученные из некодирующей ДНК, могут быть связаны с генами, например, могут быть обнаружены в гене, например, в последовательностях вверх по рамке считывания, интронах, 3'- и 5'-нетранслируемых областях (UTR) и/или областях вниз по рамке считывания. Используемый в данном документе термин «вверх по рамке считывания» применительно к нуклеиновой кислоте означает 5' относительно другой последовательности, а термин «вниз по рамке считывания» означает 3' относительно другой последовательности. Термин «вверх по рамке считывания» может использоваться взаимозаменяемо с термином «5'», когда речь идет о расположении последовательностей относительно друг друга, если в контексте явно не указано иное. Термин «вниз по рамке считывания» может использоваться взаимозаменяемо с термином «3'», когда речь идет о расположении последовательностей относительно друг друга, если в контексте явно не указано иное.

[68] В некоторых вариантах осуществления регуляторные элементы, полученные из некодирующих последовательностей ДНК, не связаны с геном, например, могут не встречаться в гене. Геномная область, из которой происходит регуляторный элемент, может отличаться от геномной области, из которой происходит функционально связанный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент происходит из дистальной геномной области или места по отношению к геномному участку или месту, из которого функционально связанный полинуклеотид (такой как кДНК, полученная из эндогенного гена или эндогенной версии гетерологичного гена, для примера) получен. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент содержит последовательности интронов. Последовательности интронов могут включать последовательности, полученные из любого гена. В некоторых вариантах осуществления

интронные последовательности получены из геномной области, из которой получен функционально связанный полинуклеотид. Например, кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут включать интроны из эндогенного гена, который соответствует полинуклеотиду или дает начало полинуклеотиду в форме кДНК. В качестве другого примера, кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут включать интроны из эндогенного гена, который не соответствует полинуклеотиду или не дает начало полинуклеотиду.

[69] В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат сигнал инициации трансляции Kozak, такой как полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат последовательность инсулятора хроматина, такую как полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4.

[70] **Последовательности Kozak:** 5'-UTR обычно включает последовательности, которые распознаются рибосомой, что позволяет рибосоме связываться и инициировать трансляцию. Типичные последовательности для инициации трансляции включают сигнальные последовательности инициации Kozak. Используемые в данном документе термины «сигнальная последовательность инициации Kozak», «консенсусная последовательность Kozak» и «последовательность Kozak» могут использоваться взаимозаменяемо, если в контексте явно не указано иное. Специалисту в данной области техники будет понятно, что сигнальная последовательность инициации Kozak может быть частично расположена в 5'-UTR и включать сам кодон инициации трансляции AUG и нуклеотид, непосредственно следующий за или ниже по рамке считывания стартового кодона AUG, как описано ниже.

[71] Инициация трансляции мРНК обычно происходит в кодоне ATG, который распознается рибосомой. Кодон ATG, с которого начинается трансляция, может не быть первым стартовым кодоном ATG, присутствующим в последовательности мРНК. Мотив, называемый последовательностью Kozak, может направлять инициацию трансляции на кодон ATG. Консенсусная последовательность Kozak определяется как 5'-(gcc)gccRccAUGG-3, где подчеркнутый AUG указывает кодон начала трансляции; заглавные буквы обозначают консервативные основания; «R» указывает на наличие пурина, чаще аденина; строчные буквы обозначают наиболее распространенное основание в положении, которое может варьироваться; и последовательность (gcc) имеет неопределенное значение. В дополнение к этим функциям другие положения и функции могут способствовать инициации трансляции. Были описаны сильные и слабые консенсусные последовательности Kozak, при этом сильная консенсусная последовательность Kozak включает в себя указанные выше признаки, которые считаются оптимальными для инициации трансляции, а слабая консенсусная последовательность Kozak включает признаки, которые отклоняются или отличаются от сильной консенсусной последовательности Kozak. Количество белка, синтезируемого из мРНК, может зависеть от силы последовательности Kozak. Например, последовательность

CCACC (SEQ ID NO: 5), расположенная непосредственно перед кодоном инициации трансляции AUG, может увеличить скорость инициации трансляции по сравнению с последовательностью, которая отличается от CCACC.

[72] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, предложенные в настоящем документе, содержат сигнал инициации трансляции Kozak. Сигнал инициации трансляции Kozak может быть расположен непосредственно выше по рамке считывания или 5' от кодона AUG инициации трансляции. Можно использовать любую консенсусную последовательность Kozak, которая является сильной последовательностью Kozak. В некоторых вариантах осуществления сигнал инициации трансляции Kozak содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:5.

[73] **Промоторы:** Промоторы являются основным *цис*-действующим элементом в конструкции генома вектора, который может определять общую силу экспрессии, а также клеточную специфичность. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления промотор является нейрон-специфичным промотором. Нейрон-специфический промотор может обеспечивать селективную экспрессию полинуклеотида или терапевтического гена в нейрональных клетках. Селективная экспрессия, ограниченная или лимитированная конкретным типом клеток, может предотвратить или уменьшить нецелевые эффекты, которые часто нежелательны и могут привести, например, к побочным эффектам. Используемый в данном документе термин «селективная экспрессия» относится к экспрессии, которая по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% и любое число или диапазон между ними, выше в нейронах по сравнению с клетками, отличными от нейронов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия отсутствует в клетках, отличных от нейронов.

[74] В некоторых вариантах осуществления нейрон-специфический промотор кассет экспрессии нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, обеспечивает экспрессию, которая по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% и любое число или диапазон между ними, выше по сравнению с экспрессией,

обеспечиваемой промотором, который может управлять экспрессией в клетках любого типа. В некоторых вариантах осуществления нейрон-специфический промотор касет экспрессии нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, обеспечивает экспрессию, которая по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% и любое число или диапазон между ними, выше по сравнению с экспрессией, обеспечиваемой промотором, который может управлять экспрессией в одном или более типах клеток, отличных от нейронов.

[75] В касетах экспрессии нуклеиновых кислот, предложенных в настоящем документе, можно использовать любой специфичный для нейронов промотор. Примеры промоторов включают промотор гена соматостатина (SST; SEQ ID NO: 2), промотор нейропептида Y (NPY; SEQ ID NO: 3), промотор альфа-кальциевой/кальмодулинкиназы 2A, промотор синапсина-1 (например, нуклеотиды 273-684 SEQ ID NO:46), нейрон-специфическую энолазу (NSE) (например, SEQ ID NO:29), промотор дофаминергического рецептора 1 (Drd1a), промотор тубулина альфа I, промотор GFAP (например, SEQ ID NO:31) и его известные варианты (например, gfaABC(1)D), и другие. Также могут быть использованы гибридные промоторы. Гибридный промотор представляет собой промотор, который включает промоторные последовательности, полученные из более чем одного гена. Промоторы могут быть из любых видов, включая, например, человека, макаку-резус, мышь, крысу и курицу. Нейрон-специфический промотор может содержать (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2; (ii) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:3; (iii) функциональный фрагмент SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; или (iv) полинуклеотид, который по меньшей мере на 95% идентичен (i), (ii) или (iii). В альтернативных аспектах этих вариантов осуществления промотор содержит CAG, CBA, UBC, PKC, EF1a, GUSB, CMV, NSE, PDGF, десмин, MCK, MeCP2, GFAP, CaMKII или MBP.

[76] Для стимуляции экспрессии в большинстве тканей можно использовать конститутивные промоторы, такие как 1 α -субъединица фактора элонгации человека (EF1 α) (например, SEQ ID NO:27 или нуклеотиды 237-1415 SEQ ID NO:44), цитомегаловирус (CMV) (например, SEQ ID NO:28), куриный β -актин (CBA) (например, SEQ ID NO:24 или нуклеотиды 237-890 SEQ ID NO:43) и его производное CAG (SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:40), β -глюкуронидазу (GUSB), убиквитин C (UBC) (например, SEQ ID NO:25 или нуклеотиды 237-1323 SEQ ID NO:42 или), фосфоглицераткиназу-1 (PGK) (например, SEQ ID NO:26) или даже нативный промотор PSEN-1 (например, нуклеотиды 237-1200 SEQ ID NO: 41). Как правило, CBA и CAG способствуют большей экспрессии среди конститутивных промоторов; однако их размер $\sim 1,7$ т.п.н. по сравнению с ЦМВ (\sim

0,8 т.п.н.) или EF1 α (~ 1,2 т.п.н.) ограничивает их использование в векторах с ограничениями упаковки, такими как AAV. Промоторы GUSB или UBC могут обеспечить повсеместную экспрессию генов с меньшим размером 378 т.п.н. и 403 т.п.н. соответственно, но они значительно слабее, чем промоторы ЦМВ или СВА. Таким образом, были проведены модификации конститутивных промоторов с целью уменьшения размера без влияния на его экспрессию, и такие примеры, как CBh (~ 800 т.п.н.) и миниСВА (~ 800 т.п.н.), могут способствовать сравнимой и даже более высокой экспрессии в выбранных тканях.

[77] Когда экспрессия ограничена определенными типами клеток внутри органа, например, головного мозга, центральной нервной системы и т. д., промоторы могут быть использованы для опосредования этой специфичности. Например, в нервной системе промоторы использовали для ограничения экспрессии нейронами, астроцитами или олигодендроцитами. В нейронах промотор нейрон-специфической енолазы (NSE, англ. neuron-specific enolase) вызывает более сильную экспрессию, чем убиквитиновые промоторы; однако его размер 2,2 т.п.н. ограничивает его использование в меньших векторах. Кроме того, промоторы В-цепи тромбоцитарного фактора роста (PDGF- β), синапсин (Syn) и белок 2, связывающий метил-СрG (MeCP2) (например, SEQ ID NO: 30), могут управлять нейрон-специфической экспрессией на более низких уровнях, чем NSE, но их размеры 1,4 т.п.н., 470 т.п.н. и 229 т.п.н., соответственно, делают их более подходящими для векторов с ограничениями по размеру. В астроцитах укороченная версия [gfaABC(1)D] промотора глиального фибриллярного кислого белка (GFAP, 2,2 т.п.н.) длиной 680 т.п.н. может обеспечивать более высокие уровни экспрессии с той же специфичностью к астроцитам, что и промотор GFAP. Нацеливание на олигодендроциты также может быть достигнуто путем отбора промотора основного белка миелина (MBP), экспрессия которого ограничена этой глиальной клеткой (Gray SJ, et al., Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. Hum Gene Ther. 2011;22:1143-1153).

[78] Тканеспецифические промоторы обеспечивают преимущество, заключающееся в ограничении экспрессии желаемой клеткой или тканью. Однако, низкий уровень экспрессии и/или большой размер могут ограничивать их использование. Чтобы компенсировать слабую силу, уровень экспрессии можно увеличить, добавив энхансерные элементы, такие как энхансерные элементы из ЦМВ.

[79] *Сайты связывания микроРНК*: В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат один, два или три сайта связывания микроРНК («микроРНК» или «микроР») для подавления экспрессии кодируемого PSEN-1 в дорсальных корешковых ганглиях. МикроРНК представляют собой некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с сайтами связывания микроРНК и подавляют экспрессию генов либо за счет снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо за счет ингибирования трансляции. В некоторых аспектах этих вариантов

осуществления каждый сайт связывания микроРНК независимо выбран из сайта связывания любой из следующих микроРНК: микроРНК-1914, микроР1181, микроР3918, микроР939, микроР324, микроР650, микроР29С или микроР2277. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления сайт(ы) связывания микроРНК расположен(ы) на 3'-конце элементу стабильности мРНК.

[80] Эндогенные микроРНК могут «де-нацеливать» или ингибировать экспрессию трансгена, когда их точные комплементарные целевые последовательности встраиваются в кассету экспрессии. Уровень репрессии *in vitro* коррелирует с количеством целевых последовательностей в кассете экспрессии. В исследовании *in vivo*, когда сконструированный лентивирусный вектор, содержащий 4 копии специфичной для нейронов целевой последовательности микроR-124, вводили в мозг мыши, РНК-управляемая экспрессия трансгена была перенаправлена с нейронов только на астроциты (Colin A. et al., Engineered lentiviral vector targeting astrocytes *in vivo*. *Glia*. 2009 Apr 15; 57(6):667-79). Эндогенные микроРНК являются полезным инструментом для получения специфичности трансгенных клеток, поскольку их соответствующие сайты связывания малы, могут комбинироваться и обладают надежной способностью ограничивать экспрессию.

[81] *Элемент стабильности мРНК*: Примеры элементов стабильности мРНК включают элемент стабильности мРНК MALAT1, С-богатые элементы стабильности НВА1, НВА2, липоксигеназу, альфа-(I)-коллаген и 3'-UTR тирозингидроксилазы, например, АU-богатые элементы (ARE) 3'-UTR, и другие. Элементом стабильности мРНК может быть, например, элемент экспрессии и удержания в ядре. Элемент стабильности мРНК может предотвращать или уменьшать деградацию мРНК. Например, деградация мРНК может быть уменьшена на около 5%, на около 10%, на около 20%, на около 30%, на около 40%, на около 50%, на около 60%, на около 70%, на около 80%, на около 90%, на около 95%, на около 99% и любое число или диапазон между ними, когда элемент стабильности мРНК включен, по сравнению с кассетой экспрессии нуклеиновой кислоты, которая не включает элемент стабильности мРНК. В одном варианте осуществления отсутствует деградация мРНК. Любая последовательность, которая предотвращает или уменьшает деградацию мРНК, может быть элементом стабильности мРНК. Элемент стабильности мРНК может быть помещен в любое место кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты. Например, элемент стабильности мРНК может быть помещен на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида и до или на 5'-конце сайта полиаденилирования. В качестве другого примера, элемент стабильности мРНК может быть помещен на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида и на 3'-конце сайта полиаденилирования. В качестве еще одного примера, элемент стабильности мРНК может быть помещен на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида.

[82] В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii).

В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичностью с SEQ ID NO:9.

[83] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один элемент стабильности мРНК содержит (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11; (ii) функциональный вариант SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii).

[84] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, включают элемент стабильности мРНК, содержащий (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:10; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичности с SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:10; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii), расположенный на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1 или другой терапевтический ген.

[85] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, включают элемент стабильности мРНК, содержащий (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:11; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере

96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичности с SEQ ID NO:11.

[86] В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичности с SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК, содержащий (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:10; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii), расположен на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1 или другой терапевтический ген.

[87] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, включают элемент стабильности мРНК, содержащий (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:11; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичности с SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК содержащий (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:11; (ii) его функциональный вариант; или (iii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с (i) или (ii), расположен на 5'-конце открытой рамки считывания нуклеотидной последовательности PSEN1.

[88] В некоторых аспектах этих вариантов осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит элемент стабильности мРНК, расположенный на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1; и элемент стабильности мРНК, расположенный 3'-конце сигнала полиаденилирования.

[89] **Сигнал полиаденилирования:** В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит один или более энхансерных элементов полиаденилирования, таких как, например, сигнальные последовательности

полиаденилирования гормона роста человека (hGH; SEQ ID NO: 33; нуклеотиды 3330-3806 SEQ ID NO: 41), сигнальные последовательности полиаденилирования бета-глобина кролика (rBG; SEQ ID NO: 34 или 35; нуклеотиды 2139-2367 SEQ ID NO: 47), сигнальные последовательности полиаденилирования SV40 или сигнальные последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH). Полиаденилирование транскрипта имеет решающее значение для ядерного экспорта, трансляции и стабильности мРНК. Следовательно, эффективность полиаденилирования транскриптов важна для экспрессии трансгенов. Хвост поли(А) содержит сайты связывания поли(А)-связывающих белков (РАВР). Эти белки взаимодействуют с другими факторами, влияя на экспорт, стабильность, распад и трансляцию мРНК. РАВР, связанные с хвостом поли(А), могут также взаимодействовать с белками, такими как факторы инициации трансляции, которые связаны с 5'-кэпом мРНК. Это взаимодействие вызывает циркуляризацию транскрипта, что впоследствии способствует инициации трансляции. Кроме того, он обеспечивает эффективную трансляцию, вызывая рециркуляцию рибосом. В то время как наличие хвоста поли(А) обычно способствует запуску трансляции, его отсутствие или удаление часто приводит к экзонуклеазно-опосредованной деградации мРНК. Само полиаденилирование регулируется последовательностями в пределах 3'-UTR транскрипта. Эти последовательности включают элементы цитоплазматического полиаденилирования (СРЕ), которые представляют собой богатые уридином последовательности, которые способствуют как активации, так и репрессии полиаденилирования. СРЕ-связывающий белок (СРЕВ) связывается с СРЕ в сочетании с множеством других белков, чтобы вызвать различные ответы.

[90] *Последовательность инсулятора хроматина*: В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность инсулятора хроматина. Упаковка генов в хроматин может сделать гены недоступными для механизма транскрипции клетки, что приводит к незначительной экспрессии генов или ее отсутствию. Инсуляторы хроматина могут защитить последовательность от упаковки в транскрипционно неактивный хроматин. Включение последовательности инсулятора хроматина в кассету экспрессии нуклеиновой кислоты может поддерживать полинуклеотид в доступном состоянии и обеспечивать возможность транскрипции. Любой инсулятор хроматина можно использовать в представленных в данном документе кассетах экспрессии нуклеиновой кислоты. Примеры последовательностей инсуляторов хроматина включают инсулятор CTCF, инсулятор gypsy и локус β-глобина. Можно использовать последовательности инсуляторов хроматина любых видов, включая млекопитающих и немлекопитающих, а также позвоночных и непозвоночных. В качестве примера можно использовать последовательность инсулятора хроматина из бета-глобинового локуса человека HS4. Другие примеры последовательностей инсуляторов хроматина включают последовательности кур и дрозофил. Последовательность инсулятора хроматина может содержать полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4, функциональный вариант SEQ ID

NO:4 или полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:4. Последовательность инсулятора хроматина может быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентична SEQ ID NO:4, пока сохраняется функция эталонной последовательности и способность защищать последовательность, с которой она связана, от упаковки в транскрипционно неактивный хроматин.

[91] *Область терминации транскрипции*: Область терминации транскрипции рекомбинантной конструкции или кассеты экспрессии представляет собой расположенную ниже регуляторную область, включающую стоп-кодон и последовательность терминатора транскрипции. Области терминации транскрипции, которые можно использовать, могут быть гомологичны области инициации транскрипции, могут быть гомологичны полинуклеотиду, кодирующему интересующий полипептид, или могут быть гетерологичными (т.е. полученными из другого источника). Область терминации транскрипции может быть либо встречающейся в природе, либо полностью или частично синтетической. 3'-некодирующие последовательности, кодирующие области терминации транскрипции, могут быть предоставлены в рекомбинантной конструкции или конструкции экспрессии и могут происходить из 3'-области гена, из которого была получена иницирующая область, или из другого гена. Известно большое количество областей терминации, которые удовлетворительно функционируют в различных хозяевах при использовании как в одних и тех же, так и в разных родах и видах, от которых они произошли. Области терминации также могут быть получены из различных генов, присущих предпочтительным хозяевам. Область терминации обычно выбирается больше для удобства, чем по какому-то конкретному свойству.

[92] Регуляторные элементы и полинуклеотиды кассет экспрессии нуклеиновых кислот, предусмотренных в настоящем документе, можно комбинировать любым образом. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1, где полинуклеотид содержит любой из (I) полинуклеотидов, представленных в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39; или (II) полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный (I) или (II). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, не менее 88%, не менее 89%, не менее 90%, не менее 91%, не менее 92%, не менее 93%, не менее

94%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% и любое число или диапазон между ними, идентичности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит один или более регуляторных элементов, функционально связанных с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин-1. В некоторых вариантах осуществления один или более регуляторных элементов содержат нейрон-специфический промотор.

[93] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит (i) сигнал инициации трансляции Kozak; (ii) последовательность инсулятора хроматина; (iii) по меньшей мере один элемент стабильности мРНК; или (iv) любую их комбинацию, где один или более регуляторных элементов содержат нейрон-специфический промотор. В некоторых вариантах осуществления сигнал инициации трансляции Kozak содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:5; последовательность инсулятора хроматина содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4; по меньшей мере один элемент стабильности мРНК содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или любую их комбинацию; нейрон-специфический промотор содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

[94] В некоторых вариантах осуществления элемент стабильности мРНК, содержащий SEQ ID NO:9, расположен на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1, и на 5'-конце сигнала полиаденилирования, элемент стабильности мРНК, содержащий SEQ ID NO:10, расположен на 5'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1, а элемент стабильности мРНК, содержащий SEQ ID NO:11, расположен на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего PSEN1.

[95] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, представленные в настоящем документе, содержат: (a) один или более регуляторных элементов, функционально связанных с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин-1, где полинуклеотид содержит любой из (I) полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39; (II) полинуклеотида, по меньшей мере на 95% идентичного (I); и при этом один или более регуляторных элементов содержат нейрон-специфический промотор, содержащий полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; (b) сигнал инициации трансляции Kozak, содержащий полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:5; (c) последовательность инсулятора хроматина, содержащую полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4; и (d) по меньшей мере один элемент стабильности мРНК, содержащий полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, или любую их комбинацию.

[96] В других вариантах осуществления предложены кассеты экспрессии

нуклеиновых кислот, содержащие: (i) любого из полинуклеотидов кДНК или гибридных геномных/кДНК, кодирующих пресенилин-1, как указано выше; (ii) сигнала инициации трансляции Kozak; (iii) нейрон-специфического промотора; (iv) последовательности инсулятора хроматина и (v) по меньшей мере один элемент стабильности мРНК или (v) любую их комбинацию. Сигнал инициации трансляции Kozak может содержать полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:5; последовательность инсулятора хроматина может содержать полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:4; по меньшей мере один элемент стабильности мРНК может содержать полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или любую их комбинацию; нейрон-специфический промотор может содержать полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

[97] Оптимизация кодонов

[98] Оптимизацию кодонов можно использовать для повышения экспрессии белка для экспрессии гетерологичного гена. Оптимизация кодонов - это метод оптимизации генов, при котором последовательность синтетического гена модифицируется, чтобы соответствовать «схеме использования кодонов» для конкретного организма. Например, чтобы оптимизировать экспрессию конкретной аминокислотной последовательности в конкретном организме, можно выбрать «наиболее часто используемые кодоны» (из списка вырожденных кодонов для аминокислоты) этим организмом. См. Таблицу 2 для списка предпочтительных используемых кодонов. После оптимизации кодонов кодируемая аминокислотная последовательность остается той же, но последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, отличается, оптимизированная для этого организма. Соответственно, в описании предложен кодон-оптимизированный полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1), подходящий для применения в композициях и способах, описанных в настоящем документе. Кодон-оптимизированный PSEN1 может включать полноразмерную гибридную геномную/кДНК (например, SEQ ID NO: 8), содержащую один или более оптимизированных кодонов, указанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид PSEN-1, содержащий SEQ ID NO: 1, содержит один или более оптимизированных кодонов, указанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1) с оптимизированным кодоном, представлен в виде SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1) с оптимизированным кодоном, представлен как SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1) с оптимизированным кодоном, представлен как SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1) с оптимизированным кодоном, представлен как SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий пресенилин-1 (PSEN1) с оптимизированным кодоном, представлен как SEQ ID NO: 39.

[99] Векторы

[100] «Вектор» представляет собой макромолекулу или ассоциацию макромолекул, которая содержит полинуклеотид или ассоциирована с ним и которая может быть

использована для обеспечения доставки полинуклеотида в клетку. Примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие носители доставки генов. Вектор может содержать один или более элементов для репликации вектора. Вектор может быть сконструирован таким образом, что в нем отсутствует один или более элементов для репликации вектора.

[101] Вектор может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором, что относится к способности вектора интегрировать кассету экспрессии нуклеиновой кислоты и/или полинуклеотид в геном клетки. Либо интегрирующий вектор, либо неинтегрирующий вектор можно использовать для доставки кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид. Примеры векторов включают, помимо прочего, (а) невирусные векторы, такие как векторы нуклеиновых кислот, включая линейные олигонуклеотиды и кольцевые плазмиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы человека (HAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и искусственные хромосомы бактерий (BAC или PAC); эписомальные векторы; транспозоны (например, PiggyBac); и (б) вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и векторы AAV. Вирусы имеют ряд преимуществ для доставки нуклеиновых кислот, включая высокую инфекционность и/или тропизм к определенным целевым клеткам или тканям. В некоторых вариантах осуществления вирус используется для доставки молекулы нуклеиновой кислоты или кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей один или более полинуклеотидов.

[102] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор. Векторы, содержащие кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, представленные в настоящем документе, могут представлять собой вирусный вектор, такой как вектор аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор.

[103] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVDJ, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV2/1, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/rh10, AAV2/11 или AAV2/12, одноцепочечный вектор AAV (оцAAV) или самокомплементарный вектор AAV (скAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой гибридный или химерный серотип AAV.

[104] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит: а) промотор, выбранный из промотора CAG, промотора пресенилина-1, промотора убиквитина С, промотора CBA, промотора синапсин-1, промотора PGK и промотора EF1 α , оперативно связанный с б) кодирующей последовательностью пресенилина-1, выбранной из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, или полинуклеотидом, обладающим по меньшей мере 95% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей, кодирующих PSEN-1, и кодирующим

аминокислотную последовательность PSEN-1 дикого типа; и с) последовательность полиаденилирования, выбранную из последовательности полиаденилирования гормона роста человека и последовательности полиаденилирования β -глобина кролика. В некоторых аспектах этих вариантов осуществления вектор AAV дополнительно содержит между промотором и последовательностью, кодирующей PSEN-1, интрон, выбранный из интрона бета-глобина человека (дикого типа или синтетического) или интрона мелкого вируса мыши.

[105] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит:

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1200 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1221-1786 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1899-3299 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3330-3806 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4553-4693 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

Нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1323 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1344-1909 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1983-3416 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3447-3923 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4554-4694 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

Нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-890 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 911-1476 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1550-2983 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3014-3490 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4553-4694 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

Нуклеотиды 1-141 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1415 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1436-2001 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2075-3508 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3539-4015 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4500-4640 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, из SEQ ID NO:44, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 95%;

Нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-664 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 684-1249 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1323-2756 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, 2787-3263 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4533-4673 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

Нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-684 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 705-1270 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1344-2777 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2808-3284 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4554-4695 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%; или

Нуклеотиды 1-105 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 113-766 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 776-867 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 881-2311 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2319-2367 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 2386-2526 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%.

[106] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит: а) нуклеотиды 1-141, 237-1200, 1221-1786, 1899-3299, 3330-3806 и 4553-4693 SEQ ID NO:41; б) нуклеотиды 1-141, 237-1323, 1344-1909, 1983-3416, 3447-3923 и 4554-4694 SEQ ID NO:42; в) нуклеотиды 1-141, 237-890, 911-1476, 1550-2983, 3014-3490 и 4553-4694 SEQ ID NO:43; г) нуклеотиды 1-141, 237-1415, 1436-2001, 2075-3508, 3539-4015 и 4500-4640 SEQ ID NO:44; д) нуклеотиды 1-141, 237-664, 684-1249, 1323-2756, 2787-3263 и 4533-4673 SEQ ID NO:45; е) нуклеотиды 1-141, 237-684, 705-1270, 1344-2777, 2808-3284 и 4554-4695 SEQ ID NO:46; или ф) нуклеотиды 1-105, 113-766, 776-867, 881-2311, 2319-2367 и 2386-2526 SEQ ID NO:47.

[107] В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-47 или нуклеотидную последовательность, имеющую 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 41-47.

[108] Специалисту в данной области должно быть понятно, что в приведенных выше вариантах осуществления векторов AAV, где последовательность имеет менее чем 100% идентичности с указанным диапазоном нуклеотидов, такая последовательность должна обеспечивать аналогичную функциональность (например, быть функциональной

парой ITR; быть функциональным промотором, который может управлять экспрессией кодирующей последовательности PSEN-1; быть функциональным интроном; кодировать ту же аминокислотную последовательность, что и PSEN-1 дикого типа; или быть функциональной последовательностью полиаденилирования).

[109] Методы, рассматриваемые в настоящем документе для генной терапии соматических клеток, включают доставку вирусным вектором (например, ретровирусным, аденовирусным, AAV, хелпер-зависимыми аденовирусными системами, гибридными аденовирусными системами, вирусом простого герпеса, вирусом оспы, лентивирусом и вирусом Эпштейна-Барр), и невирусными системами, такими как физические системы (голая ДНК, бомбардировка ДНК, электропорация, гидродинамическая доставка, ультразвук и магнитофекция) и химическими системами (катионные липиды, различные катионные полимеры и липидные полимеры).

[110] Векторы вирусной генной терапии или векторы доставки гена могут обладать способностью к воспроизводимому и/или стабильному размножению и очистке до высоких титров; для опосредования направленной доставки (например, для доставки полинуклеотида специфически в интересующую ткань или орган без широкого распространения вектора в другом месте или нецелевой доставки); и для опосредования доставки генов и/или экспрессии полинуклеотидов, не вызывая вредных побочных эффектов или нецелевых эффектов.

[111] Термин «AAV» является аббревиатурой для аденоассоциированного вируса и может использоваться для обозначения самого вируса или его производного. Термин охватывает все серотипы, подтипы, а также встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, за исключением случаев, когда требуется иное. Аббревиатура «rAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу, также называемому рекомбинантным вектором AAV (или «вектором rAAV»). Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV 12, rh10 и их гибриды, AAV птиц, AAV быков, AAV собак, AAV лошадей, AAV приматов, AAV неprimатов и AAV овец. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (КП, англ. «TR»), белков Rep и субъединиц капсида известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Используемый в данном документе термин «вектор rAAV» относится к вектору AAV, содержащему полинуклеотидную последовательность, не происходящую из AAV (т.е. полинуклеотид, гетерологичный AAV), как правило, последовательность, представляющую интерес для генетической трансформации клетки. В общем, гетерологичный полинуклеотид фланкирован по меньшей мере одной, а обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов, AAV (ITR). Термин «вектор rAAV» охватывает как векторные частицы rAAV, так и векторные плазмиды. Вектор rAAV может быть либо одноцепочечным (оцAAV), либо самокомплементарным (скAAV). «Вирус AAV», или «вирусная частица AAV», или «векторная частица rAAV» относится к

вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсулированного полинуклеотидного вектора гAAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как полинуклеотид или кассета экспрессии нуклеиновой кислоты, подлежащая доставке в клетку млекопитающего), ее обычно называют «векторной частицей гAAV» или просто «вектор гAAV». Таким образом, получение частицы гAAV обязательно включает получение вектора гAAV, поскольку такой вектор содержится в частице гAAV.

[112] Клонированная способность векторов или векторов вирусной экспрессии может представлять особую проблему для экспрессии больших полинуклеотидов. Например, векторы AAV обычно имеют упаковочную емкость ~4,8 т.п.н., лентивирусы обычно имеют емкость ~8 т.п.н., аденовирусы обычно имеют емкость ~7,5 т.п.н., а альфавирусы обычно имеют емкость ~7,5 т.п.н. Некоторые вирусы могут иметь большую упаковочную емкость, например, вирус герпеса может иметь емкость > 30 т.п.н., а вирус коровьей оспы ~ 25 т.п.н. Преимущества использования AAV для генной терапии включают низкую патогенность, очень низкую частоту интеграции в геном хозяина и способность инфицировать делящиеся и неделяющиеся клетки.

[113] Несколько серотипов AAV, непатогенного парвовируса, были сконструированы для целей доставки генов, некоторые из которых, как известно, обладают тропизмом к определенным тканям или типам клеток. Вирусы, используемые для различных применений в генной терапии, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были дефицитными по репликации или имели низкую токсичность и низкую патогенность для субъекта или хозяина. Такие векторы на основе вируса можно получить, удаляя все или некоторые кодирующие области из вирусного генома и оставляя нетронутыми те последовательности (например, последовательности инвертированных концевых повторов), которые необходимы для таких функций, как упаковка генома вектора в капсид вируса или интеграция нуклеиновой кислоты вектора (например, ДНК) в хроматин хозяина. Кассету экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащую, например, полинуклеотид, можно клонировать в вирусный каркас, такой как модифицированный или сконструированный вирусный каркас, в котором отсутствуют вирусные гены, и использовать вместе с дополнительными векторами (например, упаковывающими векторами), которые могут, например, при совместной трансфекции продуцировать частицы рекомбинантного вирусного вектора.

[114] В некоторых случаях вектор AAV или вирусная частица AAV, или вирион, используемый для доставки кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты в клетку, тип клеток или ткань, *in vivo* или *in vitro*, является дефицитным по репликации. В некоторых случаях вирус AAV создается или генетически модифицируется таким образом, что он может реплицироваться и генерировать вирионы только в присутствии хелперных факторов.

[115] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты предназначена для доставки с помощью AAV или рекомбинантного AAV

(гAAV). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии нуклеиновой кислоты доставляется с использованием лентивируса или лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления более крупные полинуклеотиды, т.е. гены, которые превышают клонирующую способность AAV, предпочтительно доставляют с использованием лентивируса или лентивирусного вектора.

[116] Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты может быть сконструирована для доставки с помощью оптимизированного терапевтического ретровирусного вектора, например, лентивирусного вектора. Ретровирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор, содержащий левый (5') LTR; последовательности, которые способствуют упаковке и/или переносу вируса в ядро, по меньшей мере один регуляторный элемент, необязательно лентивирусный элемент ответа Rev (RRE); необязательно промотор или его активную часть; полинуклеотид, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами; необязательно инсультатор; и правый (3') ретровирусный LTR. Лентивирусный вектор также может включать посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). Лентивирусный вектор может представлять собой самоинактивирующийся (SIN) лентивирусный вектор. Любая подходящая система упаковки может быть использована с лентивирусным вектором, включая, например, системы упаковки второго, третьего и четвертого поколения. Лентивирусный вектор может быть псевдотипирован. Для псевдотипирования можно использовать любой гликопротеин оболочки, включая, например, гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, лиссавируса, вируса Мокола, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вируса лихорадки Ласса (LFV), ретровирусов, вируса мышинного лейкоза Молони (MuLV), филовирусы, парамиксовирусы, вирус кори, вирус Нипах, ортомиксовирусы и другие. Лентивирусный вектор может быть псевдотипирован для изменения тропизма. Псевдотипирование может быть нацелено на любой тип клеток, включая, например, нейронные клетки.

[117] Способы лечения

[118] В настоящем документе описаны способы лечения нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты. Любое нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние можно лечить с помощью кассет экспрессии нуклеиновых кислот, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, семейную болезнь Альцгеймера, спорадическую болезнь Альцгеймера, болезнь Альцгеймера с поздним началом, лобно-височную деменцию, лобно-височную долевую деменцию, болезнь Пика, деменцию с тельцами Леви, потерю памяти, когнитивные нарушения, или легкие когнитивные нарушения. Другие иллюстративные нейродегенеративные заболевания, расстройства или состояния включают таупатию, первичную возрастную таупатию (ПВТ), хроническую

травматическую энцефалопатию (ХТЭ), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), корково-базальную дегенерацию (КБД), лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17), боковой амиотрофический склероз-паркинсонизм-деменция (БАС-PDC, болезнь Литико-Бодига), ганглиоглиому, ганглиоцитому, менингиоангиоматоз, постэнцефалитический паркинсонизм, подострый склерозирующий панэнцефалит (ПСПЭ), свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, нейродегенерацию, ассоциированную с пантотенаткиназой, синуклеинопатию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию (МСА), нейроаксональные дистрофии, паркинсоноподобную болезнь, паркинсонизм, прионные болезни, болезни мотонейронов, деменцию, трансмиссивные губчатые энцефалопатии, системные атрофии, преимущественно поражающие центральную нервную систему, нарушения тринуклеотидных повторов, протеопатии, амилоидоз, нейрональные цероидные липофуцинозы, боковой амиотрофический склероз (БАС), Болезнь Гентингтона, черепно-мозговую травму, инсульт, расстройство аутистического спектра (РАС), депрессию, тревогу, посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), шизофрению, синдром дефицита внимания/гиперактивности (СДВГ), биполярное расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР), расстройство личности, боль и др.

[119] Семейная болезнь Альцгеймера (СБА) или семейная болезнь Альцгеймера с ранним началом (СБАРН) - это необычная форма болезни Альцгеймера, которая обычно проявляется в более раннем возрасте и определяемом как возраст до 65 лет (обычно между 50 и 65 годами). СБА наследуется по аутосомно-доминантному типу. Мутации в трех разных генах были идентифицированы как ответственные за развитие СБА, и другие гены изучаются. Используемый в данном документе термин «СБА» относится к болезни Альцгеймера, вызванной мутацией любого из этих трех генов, которые кодируют пресенилин-1 (PSEN-1), пресенилин-2 (PSEN-2) и белок-предшественник амилоида (APP). Предполагается, что термин «СБА, опосредованная PSEN-1» относится только к СБА, вызванной мутацией в гене PSEN-1.

[120] Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение», «терапия», «терапевтический» и т.п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта, включая, помимо прочего, облегчение, отсрочку или замедление прогрессирования, уменьшения эффектов или симптомов, ингибирования, облегчения начала заболевания или расстройства, получения полезного или желаемого результата в отношении заболевания, расстройства или медицинского состояния, такого как терапевтическое преимущество и/или профилактическое преимущество. «Лечение», как используется в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и включает: (а) ингибирование заболевания, т.е. остановку его развития; и (b) облегчение заболевания, т.е. вызывание регрессии заболевания. Терапевтическая польза включает устранение или уменьшение интенсивности симптомов основного заболевания, подлежащего лечению. Кроме того, терапевтическая польза достигается за счет устранения или улучшения одного или

нескольких физиологических симптомов, связанных с основным заболеванием, так что у субъекта наблюдается улучшение, несмотря на то, что субъект все еще может страдать от основного заболевания. Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для любого млекопитающего или другого животного. В некоторых случаях лечение может привести к уменьшению или прекращению симптомов. Профилактический эффект включает отсрочку или устранение появления заболевания или состояния, отсрочку или устранение появления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования заболевания или состояния или любую их комбинацию.

[121] Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к любому индивидууму или пациенту, в отношении которого применяются способы, описанные в настоящем документе. Термин «субъект» может использоваться взаимозаменяемо с термином «индивидуум» или «пациент». Субъектом может быть человек, хотя субъект может быть животным, что понятно специалистам в данной области. Таким образом, другие животные, включая млекопитающих, таких как грызуны (включая мышей, крыс, хомяков и морских свинок), кошек, собак, кроликов, сельскохозяйственных животных, включая коров, лошадей, коз, овец, свиней и т. д., и приматов (включая обезьян, шимпанзе, орангутанов и горилл) включены в определение субъекта.

[122] Векторы, представленные в настоящем документе, можно вводить в количестве, эффективном для лечения нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния. Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству композиции, описанной в настоящем документе, которое достаточно для воздействия на предполагаемое применение, включая, помимо прочего, лечение заболеваний, как определено в данном документе. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого лечебного применения (*in vivo*) или подлежащего лечению субъекта и состояния заболевания, например, веса и возраста субъекта, тяжести состояния заболевания, способа введения и т.п., что может быть легко определено специалистом в данной области техники. Этот термин также применяется к дозе, которая вызывает конкретный ответ в целевой клетке. Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретной выбранной композиции, режима дозирования, которому необходимо следовать, от того, вводится ли она в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую ее вводят, и физической системы доставки, в которой она переносится. Примерные дозы вектора AAV, которые можно вводить, включают около 10^3 копий генома (КГ)/кг, 10^4 КГ/кг, 10^5 КГ/кг, 10^6 КГ/кг, 10^7 КГ/кг, 10^8 КГ/кг, 10^9 КГ/кг, 10^{10} КГ/кг, 10^{11} КГ/кг, 10^{12} КГ/кг, 10^{13} КГ/кг, 10^{14} КГ/кг, и любое число или диапазон между ними, хотя можно использовать более высокие или более низкие дозы.

[123] Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут быть доставлены любым подходящим способом или векторами. Типичные способы включают внутривенную инъекцию, стереотаксическую инъекцию и внутривенную инъекцию. В некоторых

вариантах осуществления кассеты экспрессии нуклеиновых кислот доставляют в виде вирусных векторов.

[124] Описанные в данном документе процедуры используют, если не указано иное, обычные методы химии, молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии, клеточной биологии, клеточных культур и трансгенной биологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники (См., например, Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Sambrook, et al., (1989); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (including periodic updates) (1992); Glover, *DNA Cloning*, IRL Press, Oxford (1985); Russell, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, Academic Press, NY (1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, NY (1991); Harlow and Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, A. R. Liss, Inc. (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., NY); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155, Wu, et al., eds.; *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds. (1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1988); Fire, et al., *RNA Interference Technology From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge (2005); Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH (2005); Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press (2003); Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, N.J. (2004); и Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC (2004)).

[125] Композиции и способы более подробно описаны ниже, и приведенные в данном документе примеры предназначены только для иллюстрации, поскольку специалистам в данной области техники будут очевидны их многочисленные модификации и вариации.

[126] Термины, используемые в описании, обычно имеют свои обычные значения в данной области, в контексте композиций и способов, описанных в настоящем документе, и в конкретном контексте, где используется каждый термин. Некоторые термины были более конкретно определены ниже, чтобы предоставить практикующему врачу дополнительные рекомендации относительно описания композиций и способов.

[127] Все патенты, патентные заявки и другие научные или технические

документы, упомянутые где-либо в данном документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Варианты осуществления настоящего изобретения, иллюстративно описанные в данном документе, могут быть соответствующим образом осуществлены на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не описанных в данном документе. В каждом случае в данном документе любой из терминов «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» может быть заменен любым из двух других терминов, сохраняя при этом свое обычное значение. Примененные в данном документе термины и выражения использовались в качестве терминов описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений нет намерения исключать какие-либо эквиваленты продемонстрированных и описанных признаков или их частей, но признается, что возможны различные модификации в пределах объема заявленного изобретения. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение было конкретно описано в вариантах осуществления, специалисты в данной области могут прибегать к дополнительным функциям, модификации и вариациям концепций, раскрытых в данном документе, и что такие модификации и вариации рассматриваются как находящиеся в пределах объема данного изобретения, как определено описанием и прилагаемой формулой изобретения.

[128] Всякий раз, когда в описании указывается диапазон, например диапазон температуры, диапазон времени, диапазон состава или концентрации, все промежуточные диапазоны и поддиапазоны, а также все отдельные значения, включенные в указанные диапазоны, должны быть включены в изобретение. Следует понимать, что любые поддиапазоны или отдельные значения в диапазоне или поддиапазоне, которые включены в настоящее описание, могут быть исключены из представленных в данном документе аспектов. Следует понимать, что любые элементы или этапы, включенные в настоящее описание, могут быть исключены из заявленных композиций или способов.

[129] Кроме того, если признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша или другой группировки альтернатив, специалисты в данной области техники поймут, что данное изобретение также таким образом описано в терминах любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша или другой группы.

[130] Ниже представлены примеры, описывающие терапевтические полинуклеотиды, кодирующие пресенилин-1, предполагаемые для обсуждаемых применений. Последующее представлено только в целях иллюстрации, чтобы дополнительно проиллюстрировать варианты осуществления настоящего изобретения, и не предназначено для ограничения объема изобретения, описанного выше в общих чертах. Хотя они типичны для тех, которые могут быть использованы, в качестве альтернативы могут быть использованы другие процедуры, методологии или методы, известные специалистам в данной области.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[131] В этом примере описывается модификация кДНК пресенилина-1 человека (PSEN1) путем оптимизации кодонов.

[132] Нативная последовательность кДНК гена пресенилина-1 человека (PSEN1; номер доступа GenBank NM_000021.4, SEQ ID NO:1) показана ниже (раздел ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ). Кодирующие последовательности подчеркнуты в SEQ ID NO: 1. Кодирующая последовательность, присутствующая в SEQ ID NO: 1, повторяется как SEQ ID NO: 15, которая разбита на кодоны, а нетолерантные кодоны подчеркнуты. Открытая рамка считывания, кодирующая сам белок, соответствует нуклеотидам (нт) с 213 по 1616. Примечательными элементами мРНК являются длинная 5'-нетранслируемая последовательность (212 нт) и длинная 3'-нетранслируемая последовательность (4012 нт). Стартовому кодону в нт 213 предшествует слабый сигнал инициации трансляции Kozak STCCA, в котором отсутствует остаток А в положении -3 относительно остатка А стартового кодона AUG, определяемого как +1.

[133] Нативную кДНК PSEN1 (SEQ ID NO:1) модифицировали путем оптимизации кодонов. Можно использовать несколько методов оптимизации кодонов, в которых последовательность ДНК, кодирующая белок, изменяется таким образом, что это не влияет на последовательность белка. Оптимизация кодонов идентифицирует предпочтительные кодоны на основе статистических обзоров использования кодонов или уровня родственной тРНК в клетках.

[134] SEQ ID NO:6 представляет собой оптимизированную по кодонам кДНК PSEN1, которая была создана путем модифицированной оптимизации кодонов с дополнительным ограничением, заключающимся в разрешении только толерантных изменений синонимичными кодонами. Толерантность определяли путем сравнения последовательностей ДНК, кодирующих один и тот же белок у родственных видов. Например, выбор кодона, одинаковый у всех родственных видов, означает, что изменение этого кодона недопустимо. Таким образом, только кодоны, толерантные к изменениям, модифицируют в предпочтительные синонимичные кодоны.

[135] SEQ ID NO:6 была создана на основе открытой рамки считывания n=11 кДНК приматов (таблица 1). Последовательности кДНК были получены из GenBank и выровнены с использованием средств CLUSTAL OMEGA (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Из 467 кодонов кДНК PSEN1 человека 267 были инвариантными среди всех 11 видов. Они были обозначены как кодоны, нетолерантные к изменениям, и были сохранены в SEQ ID NO:6.

Таблица 1. Открытые рамки считывания кДНК PSEN1 приматов.

№	Код GenBank	Отряд	Род/вид	Общее название
1	NM_000021.4	Настоящие обезьяны	Homo sapiens	Человек
2	XM_024231237.1	Настоящие	Pongo abelii	Орангутан

		обезьяны		
3		Настоящие обезьяны	Nomascus leucogenys	Гиббон
4	XM_007987195.1	Узконосые обезьяны	Chlorocebus sabaeus	Африканский зеленый
5	XM_028850213.1	Узконосые обезьяны	Macaca mulatta	Резус
6	XM_011983100.	Узконосые обезьяны	Mandrillus leucophaeus	Дрил
7		Широконосые обезьяны	Aotus nancymaе	Западноамазонская мирикина
8	XM_003924504.2	Широконосые обезьяны	Saimiri boliviensis boliviensis	Боливийский саймири
9	XM_021718361.1	Долгопятовые	Carlito syrichta	Филиппинский долгопят
10	XM_012656183.1	Полуобезьяны	Propithecus coquereli	Ореховая сифака
11	NM_001309945.1	Полуобезьяны	Microcebus murinus	Серый мышинный лемур

[136] Для остальных кодонов, толерантных к изменениям, были выбраны синонимичные кодоны в местах со смещением выбора кодона в генах человека.

[137] Шаг 1. Взяли кДНК человека. Приняли все 267 кодонов, консервативных у 11 приматов. Изменили толерантные кодоны в соответствии с правилами в таблице 2.

Таблица 2: Предпочтительные оптимизированные кодоны

Аминокислота	Наиболее предпочтительный кодон	Предпочтительный кодон	Непредпочтительный	Крайне неpreferиительный
А (аланин)	GCC	GCT, GCA		GCG
С (цистеин)		TGT, TGC		
Д (аспарат)		GAT, GAC		
Е (глутамат)		GAA, GAG		
Ф (фенилаланин)		TTT, TTC		
Г (глицин)	GGC	GGA, GGG	GGT	
Н (гистидин)	CAC		CAT	
І (изолейцин)	ATC	ATT	ATA	

К (лизин)		AAA, AAG		
L (лейцин)	CTG	CTC	TTG, CTT	TTA, CTA
M (метионин)		ATG		
H (аспарагин)		AAT, AAC		
P (пролин)	CCT	CCC, CCA		CCG
Q (глутамин)	CAG		CAA	
R (аргинин)	AGA, AGG	CGC, CGG	CGA	CGT
S (серин)	AGC	TCT, TCC, TCA, AGT		TCG
T (теонин)	ACC	ACT, ACA		ACG
V (валин)	GTG	GTC	GTT, GTA	
W (триптофан)		TGG		
Y (тирозин)		TAT, TAC		
Стоп	TGA	TAA	TAG	

ПРИМЕР 2

[138] В этом примере описывается модификация кДНК пресенилина-1 человека (PSEN1) путем удаления динуклеотидов CpG.

[139] В ДНК млекопитающих происходит избирательное метилирование динуклеотидов CpG. Это влияет на рекрутирование белков хроматина, что, в свою очередь, влияет на экспрессию генов. Кроме того, существует врожденный иммунный ответ на вновь введенную ДНК, направленный на устранение вирусной инфекции. Этот врожденный иммунный ответ опосредуется толл-подобным рецептором 9 (TLR9), который распознает неметилированные динуклеотиды CpG.

[140] SEQ ID NO:7 использует избыточность генетического кода для полного устранения динуклеотидов CpG в кДНК PSEN1. Количество динуклеотидов CpG уменьшилось с 24 в нативной кДНК до нуля. Устранение динуклеотидов CpG может уменьшить распознавание вирусных векторов, таких как, например, AAV, и полинуклеотидов антигенпрезентирующими клетками и уменьшить иммунные ответы на генную терапию, тем самым пролонгируя экспрессию полинуклеотидов и снижая потребность в иммуносупрессивной терапии. Однако было невозможно устранить все динуклеотиды CpG, сохранив при этом все нетолерантные кодоны. Таким образом, SEQ ID NO:7 включает изменения в шести нетолерантных кодонах, как показано подчеркиванием в этой последовательности.

[141] SEQ ID NO:36 использует избыточность генетического кода для удаления как можно большего количества динуклеотидов CpG в кДНК PSEN1 без изменения каких-либо нетолерантных кодонов. В этой конструкции количество динуклеотидов CpG было уменьшено с 24 в нативной кДНК до пяти.

ПРИМЕР 3

[142] В этом примере описывается модификация кДНК пресенилина-1 человека (PSEN1) путем включения геномных последовательностей.

[143] Предыдущие конструкции генной терапии вводили экзогенные или искусственные интроны в кассету экспрессии. Например, многие векторы AAV, используемые в клинических испытаниях, используют промотор CAG, который включает искусственный гибридный интрон генов бета-актина курицы и бета-глобина кролика.

[144] SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность гибридного геномного гена/кДНК PSEN1, предназначенную для направления пре-мРНК в аппарат для сплайсинга и, таким образом, для повышения ядерного экспорта и общего уровня мРНК. SEQ ID NO:8 представляет собой укороченную геномную версию PSEN1, которая включает экзоны 2, интрон 2, экзон 3, интрон 3, экзон 4, интрон 4, за которыми следует остаток гена, кодирующего белок, в форме кДНК. Интроны 3 и 4 слишком велики, чтобы их можно было вставить, например, в вектор переноса гена AAV, и поэтому они укорочены внутри. Не ограничиваясь теорией, как правило, факторы сплайсинга связываются вблизи концов интронов, и поэтому внутренние делеции не мешают сплайсингу.

[145] Важно отметить, что мРНК PSEN1 обнаруживается в двух формах: одна кодирует наиболее распространенный белок длиной 467 аминокислот, а альтернативная версия (X2) кодирует версию пресенилина-1 из 463 аминокислот. В начале интрона 3 есть два донора сплайсинга, разделенные 12 нт. Альтернативный сплайсинг в этом месте приводит к различным мРНК, кодирующим белки, отличающиеся делецией 4 аминокислот. Значение этого альтернативного сплайсинга неизвестно, но изоформа X2 наблюдается у широкого круга приматов (например, у сурков: Gen Bank ссылается на изоформу пресенилина-1 XP_027787309.1 и изоформу X2 пресенилина-1 XP_027787310.1). Это предполагает некоторое физиологическое значение.

[146] SEQ ID NO:8 была разработана с учетом важных особенностей интрона 4, которые позволяют проводить альтернативный сплайсинг для получения изоформ X1 и X2. Не ограничиваясь теорией, SEQ ID NO:8 будет экспрессировать обе изоформы и, следовательно, обеспечивать полный спектр физиологических эффектов, которые обеспечивает нативный ген PSEN1.

ПРИМЕР 4

[147] В этом примере описывается идентификация специфичных для нейронов последовательностей промоторов.

[148] Экспрессия PSEN1 должна быть специально ограничена нейронами, чтобы предотвратить накопление A β в нейронах. Ранее сообщалось, что векторы генной терапии AAV со специфичной для нейронов экспрессией включали промоторы специфичной для нейронов эластазы и синапсина-1.

[149] Доступность данных РНК-Сек для нескольких типов клеток позволила провести беспристрастный поиск генов, специфичных для нейронов с высокой

экспрессией (см. web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html). Гены с высоким соотношением экспрессии нейронов и эндотелия были идентифицированы и отсортированы по уменьшению уровня экспрессии нейронов. Затем гены были проверены вручную, чтобы исключить кандидатов с потенциально искажающими факторами (например, материнская экспрессия/множественные сайты начала транскрипции), которые могут ограничивать применимость. С помощью этого способа были идентифицированы две новые высокоэкспрессированные нейрон-специфические промоторные последовательности, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3.

[150] SEQ ID NO:2 включает фрагмент из 480 пар нуклеотидов (п.н.) гена соматостатина человека (SST) от -407 до +73 относительно сайта начала транскрипции. Ранее сообщалось об использовании промотора SST от макаки-резуса с фрагментом размером ~ 300 п.н., который управляет нейрон-специфической экспрессией репортерного полинуклеотида в контексте переноса лентивирусного гена.

[151] SEQ ID NO:3 включает сегмент из 1000 п.н. от -952 до +48 относительно начала мРНК промотора нейропептида Y человека (NPY). Это обеспечит очень специфический паттерн экспрессии в мозгу.

ПРИМЕР 5

[152] В этом примере описаны регуляторные элементы для увеличения экспрессии полинуклеотидов.

[153] SEQ ID NO:4 из локуса бета-глобина человека, называемого HS4, может функционировать как последовательность инсулятора хроматина. Он использовался в контексте векторов переноса гена лентивируса для обеспечения постоянной экспрессии введенных полинуклеотидов.

[154] SEQ ID NO:5 представляет собой сигнал инициации трансляции Kozak. Его можно использовать для замены слабого неконсенсусного сигнала Kozak в нативной мРНК гена PSEN1.

[155] SEQ ID NO:4 и/или SEQ ID NO:5 можно использовать в кассетах экспрессии нуклеиновых кислот в сочетании с любыми элементами и признаками, описанными в настоящем документе. Например, SEQ ID NO:4 и/или SEQ ID NO:5 можно использовать в кассетах экспрессии нуклеиновых кислот, которые включают любую из синтетических последовательностей кДНК PSEN1, представленных в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8. Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут дополнительно включать любой из нейрон-специфических промоторов SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. Кроме того, кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут включать любую из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, описанных ниже (пример 6), которые усиливают экспрессию мРНК, обеспечивая стабильность мРНК или усиливая транскрипцию и процессинг мРНК, или любую комбинацию SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

ПРИМЕР 6

[156] В этом примере описаны регуляторные последовательности, которые

усиливают экспрессию полинуклеотидов, придавая стабильность мРНК или усиливая транскрипцию и процессинг мРНК.

[157] SEQ ID NO:9 представляет собой элемент экспрессии и удерживания в ядре, который придает стабильность мРНК. Элементы экспрессии и удержания в ядре стабилизируют мРНК, образуя сложные вторичные структуры с терминальной полиаденилированной последовательностью мРНК, тем самым ингибируя деградацию от 3' до 5'. Не ограничиваясь теорией, вставка этой последовательности за пределами открытой рамки считывания и перед сайтом полиаденилирования обеспечит стабильность мРНК промотора.

[158] SEQ ID NO:10 соответствует 3'-некодирующей последовательности нативной кДНК PSEN1. Не ограничиваясь теорией, 3'-нетранслируемые последовательности могут содержать важные элементы, которые усиливают транскрипцию и процессинг мРНК, тем самым усиливая экспрессию полинуклеотидов или генов. SEQ ID NO:10 частично или полностью может быть добавлена к 5'-концу любой последовательности, кодирующей пресенилин, для повышения уровня экспрессии.

[159] SEQ ID NO:11 соответствует 5'-некодирующей последовательности нативной кДНК PSEN1. Не ограничиваясь теорией, 5'-нетранслируемые последовательности могут содержать важные элементы, повышающие стабильность мРНК, тем самым повышая экспрессию полинуклеотидов или генов. SEQ ID NO:11 частично или полностью может быть добавлена к 3'-концу любой последовательности, кодирующей пресенилин, для повышения уровня экспрессии.

[160] SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11 можно использовать в любой комбинации в кассетах экспрессии нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе. Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот, которые включают SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или любую комбинацию SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, могут иметь любую комбинацию элементов и признаков, описанных в данном документе. Например, кассета экспрессии, которая включает SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или любую комбинацию SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, может включать любую одну из синтетических последовательностей кДНК PSEN1, представленных в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8. Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут дополнительно включать любой из нейрон-специфических промоторов SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут также включать дополнительные регуляторные элементы, повышающие экспрессию полинуклеотидов, такие как SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 или оба.

ПРИМЕР 7

[161] В этом примере описывается конструкция кассет экспрессии пресенилина-1 (PSEN1).

[162] Любые элементы и признаки, описанные в настоящем документе, включая последовательности, указанные в SEQ ID NO: 2-11, могут быть объединены в кассеты

экспрессии пресенилина-1. Например, кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут включать любую из синтетических последовательностей кДНК, представленных в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, которые кодируют PSEN1. Экспрессия любой из синтетических кДНК может управляться нейрон-специфическим промотором SEQ ID NO:2, полученным из гена соматостатина человека (SST), или SEQ ID NO:3, полученным из промотора человеческого нейропептида Y (NPY).

[163] Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты, которая имеет любую из синтетических последовательностей кДНК и последовательностей промотора, описанных выше, может дополнительно включать любые элементы, повышающие экспрессию полинуклеотидов, включая, например, последовательность инсулятора хроматина SEQ ID NO:4, консенсусную последовательность Kozak SEQ ID NO:5, элемент стабильности мРНК SEQ ID NO:9, 3'-некодирующую последовательность SEQ ID NO:10, полученную из нативной кДНК PSEN1, 5'-некодирующую последовательность SEQ ID NO:11, полученную из нативной кДНК PSEN1, или любую комбинацию этих элементов. Выбор элементов может основываться, например, на желаемых уровнях экспрессии. Например, уровни экспрессии могут варьироваться в зависимости от типа клеток или области мозга, в которой находится нейрон, что можно использовать в качестве руководства или критерия для включения или исключения регуляторных элементов, влияющих на любой этап экспрессии генов, таких как, например, транскрипция мРНК, процессинг, стабильность и/или трансляцию.

[164] Кассеты экспрессии нуклеиновых кислот могут быть включены, например, в вирусный вектор. Можно использовать любой вирусный вектор, включая, например, векторы аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы, ретровирусные векторы и аденовирусные векторы.

ПРИМЕР 8

[165] В этом примере описывается синтез двух различных кодон-оптимизированных конструкций PSEN-1 и экспрессия белка пресенилина-1 из каждой из конструкций, а также из конструкции, содержащей кодирующую последовательность PSEN-1 дикого типа.

[166] Конструкции, кодирующие кодон-оптимизированный пресенилин-1 человека, были разработаны путем внесения изменений в последовательность кДНК, кодирующую PSEN-1 дикого типа, только в тех кодонах, которые являются переменными в последовательностях приматов. Последовательность кДНК PSEN-1 дикого типа содержит 267 кодонов, которые являются консервативными для 11 последовательностей приматов (см. подчеркнутые кодоны в SEQ ID NO:15). Эти нетолерантные кодоны были оставлены без изменений. Оставшиеся 200 толерантных кодонов в кДНК дикого типа рассматривались для оптимизации.

[167] Для одной конструкции (v2.0) были внесены консервативные замены кодонов (34 кодона нижним регистром) для создания SEQ ID NO:38. Нативные кодоны кДНК PSEN-1 дикого типа были сохранены для кодонов, транслируемых в: фенилаланин,

тирозин, цистеин, гистидин, аспарагин, лизин, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту, потому что только два разных кодона одинакового использования у приматов кодируют эти аминокислоты. Для кодонов, кодирующих глутамин, предпочтительным был CAG. Для кодонов, кодирующих изолейцин, кодоны ATA были заменены на ATC, и либо ATC, либо ATT были сохранены, если они присутствовали в нативной последовательности. Кодоны, кодирующие метионин (ATG) и триптофан (TGG), не изменяли. Для кодонов, кодирующих пролин, треонин и аланин, каждый кодон, оканчивающийся гуанином (G), был заменен избыточным кодоном, оканчивающимся цитозином (C). Для кодонов, кодирующих валин и глицин, каждый кодон, оканчивающийся тиминном (T) или аденином (A), был заменен на избыточный кодон, оканчивающийся цитозином (C) или гуанином (G), соответственно. Кодоны AGG, AGA, CGC, CGG, AGT, AGC, TCC, TCT, TCA, TTG, CTC и CTG остались без изменений. Кодоны CGT заменены на CGC; кодоны CGA заменены на CGG; кодоны TCG заменены на TCC; кодоны TTA заменены на TTG; кодоны CTT заменены на CTC; и кодоны СТА были заменены на CTG.

[168] Для другой конструкции (v1.5) было сделано больше изменений кодонов (138 кодонов нижним регистром) для конструкции SEQ ID NO:37 по сравнению с нативной последовательностью. В этой конструкции нативные кодоны были сохранены для кодонов, транслируемых в: триптофан, цистеин и метионин. Для кодонов, кодирующих глутамин, выбранные кодоны САА были заменены на CAG. Для кодонов, кодирующих изолейцин, выбранные кодоны ATA и ATT были заменены на ATC. Для кодонов, кодирующих пролин, выбранные кодоны были заменены на CCC или CCT. Для кодонов, кодирующих треонин, выбранные кодоны были заменены на ACC или ACA. Для кодонов, кодирующих аланин, выбранные кодоны были заменены на GCC или GCT. Кодоны, кодирующие глицин, не оканчивающиеся цитозином (C), были заменены избыточными кодонами, оканчивающимися цитозином (C). Для кодонов, кодирующих валин, предпочтительным был GTG. Кодоны AGC остались без изменений. Для кодонов, кодирующих аспарагиновую кислоту, выбранные кодоны были заменены на GAT или GAC. Для кодонов, кодирующих глутаминовую кислоту, предпочтительными были GAA или GAG. Для кодонов, кодирующих фенилаланин, кодоны TTT были заменены на TTC. Для кодонов, кодирующих гистидин, кодоны CAT были заменены на CAC. Для кодонов, кодирующих лизин, выбранные кодоны AAA были заменены на AAG. Для кодонов, кодирующих лейцин, большинство выбранных кодонов были заменены на CTG. Для кодонов, кодирующих аспарагин, кодоны AAT были заменены на AAC. Для кодонов, кодирующих аргинин, предпочтение отдавалось AGA, но также использовались кодоны AGG и CGG. Для кодонов, кодирующих серин, предпочтительным был AGC, но TCC и TCT также использовались для выбранных кодонов. Для кодонов, кодирующих тирозин, кодоны TAT были заменены на TAC.

[169] Каждую из последовательностей, кодирующих PSEN-2.0, PSEN-1.5 и PSEN-1 дикого типа, отдельно клонировали в клонирующий вектор pCMV6-XL5 (Origene,

Rockville, MD). Полученные конструкции (ДТ (pAT001), v1.5 (pAT010) и v2.0 (pAT012)) трансфицировали в клетки НЕК293 для определения влияния оптимизации кодонов на экспрессию пресенилина-1. Клетки 293 собирали через 48 часов после трансфекции, лизировали с использованием 300 мкл буфера RIPA (50 mM основания/трис-НСl, 150 mM хлорида натрия, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% заменителя Nonidet P-40 с добавлением cOmplete™, Мини, коктейль ингибиторов протеазы без ЭДТА, Sigma Aldrich), и собирали супернатант. Концентрацию общего белка в каждом образце измеряли с помощью белкового анализа THERMO SCIENTIFIC™ PIERCE™ BCA™ в соответствии с инструкциями производителя.

[170] ИФА для обнаружения человеческого белка пресенилина-1 (PS1) в клеточных лизатах проводили с использованием набора для ИФА пресенилина-1 человека RayBio®. Линейность разведения (ЛР) и пиковое восстановление (ПВ) оценивали с использованием нетрансфицированных клеток 293 для проверки совместимости клеточных лизатов с этим набором ИФА. В таблице 3 показано, что клеточные лизаты демонстрируют приемлемую линейность разведения (1:250-1:1000) и пиковое восстановление.

Таблица 3. Линейность разведения и пиковое восстановление

ID образца	Ожидаемая концентрация (пг/мл)	Интерполированные значения (пг/мл)		Точность (%) RE)	Точность (%) CV)	ПВ/ЛР %
Неразбавленный образец (клеточный лизат)	--	67,18	63,88	--	3,56%	--
Контрольный пик (разбавитель для анализа)	750	800,47	834,07	8,97%	2,91%	
Пик образца (клеточный лизат)	750	808,80	1068,02	25,12%	19,53%	99%
Разведение 1:250 (клеточный лизат)	3000	2490,14	2654,88	14,25%	4,53%	83%
Разведение 1:500 (клеточный лизат)	1500	1305,48	1320,87	12,46%	0,83%	87%

лизат)						
Разведение 1:1000 (клеточный лизат)	750	747,87	766,82	0,98%	1,77%	100%

[171] ИФА для обнаружения человеческого белка пресенилина-1 (PS1) в лизатах трансфицированных клеток 293 проводили с использованием набора для ИФА пресенилина-1 человека RayBio®. Технические повторности анализировали в разведении 1:1000 в соответствии с инструкциями производителя. Таблица 4 и ФИГ. 1 показывают, что трансфекция плазмидой рАТ010 приводила к 2,5-кратному увеличению экспрессии PS1 по сравнению с нативной последовательностью.

Таблица 4. Экспрессия PS1 в лизатах трансфицированных клеток 293

ID образца	Интерполированные значения (пг/мл)		Среднее (пг/мл)	Точность (% CV)	Разведение	общий белок, мкг/ мл	пг PS1/мкг общего белка
рАТ001 ДТ Повтор 1	196,63	202,47	199,55	2%	1000	854,3	233,59
рАТ001 ДТ Повтор 2	225,13	227,79	226,46	1%	1000	820,4	276,03
рАТ010 V1.5 Повтор 1	486,76	499,90	493,33	2%	1000	675,4	730,39
рАТ010 V1.5 Повтор 2	418,15	413,65	415,90	1%	1000	767,1	542,14
рАТ012 V2.0 Повтор 1	209,48	240,41	224,95	10%	1000	824,1	272,95
рАТ012 V2.0 Повтор 2	215,98	223,97	219,98	3%	1000	645,9	340,60

ПРИМЕР 9

[172] В этом примере описывается другая кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая PSEN-1.

[173] Для конструкции v3.0 (SEQ ID NO:39) были заменены 140 толерантных

кодонов (указанных строчными буквами), а также стоп-кодон по сравнению с кодонами, присутствующими в кодирующей последовательности PSEN-1 дикого типа. Кодоны, кодирующие метионин (ATG) и триптофан (TGG), не изменяли. Для кодонов, кодирующих глутамин (Q), все толерантные кодоны были заменены на CAG. Для кодонов, кодирующих изолейцин (I), все толерантные кодоны были заменены на ATC. Для кодонов, кодирующих пролин (P), все толерантные кодоны были заменены на CCC. Для кодонов, кодирующих треонин (T), все толерантные кодоны были заменены на ACC. Для кодонов, кодирующих аланин (A), все толерантные кодоны были заменены на GCC. Для кодонов, кодирующих глицин (G), все толерантные кодоны были заменены на GGC. Для кодонов, кодирующих валин (V), все толерантные кодоны были заменены на GTG. Для кодонов, кодирующих аспарагиновую кислоту (D), все толерантные кодоны были заменены на GAC. Для кодонов, кодирующих глутаминовую кислоту (E), все толерантные кодоны были заменены на GGC. Для кодонов, кодирующих фенилаланин (F), все толерантные кодоны были заменены на TTC. Для кодонов, кодирующих гистидин (H), все толерантные кодоны были заменены на SAC. Для кодонов, кодирующих лизин (K), все толерантные кодоны были заменены на AAG. Для кодонов, кодирующих лейцин (L), все толерантные кодоны были заменены на CTG. Для кодонов, кодирующих аспарагин (N), все толерантные кодоны были заменены на ACC. Для кодонов, кодирующих аргинин (R), все толерантные кодоны были заменены на AGA, за исключением кодона 307, который был заменен с AGG на CGG. Для кодонов, кодирующих серин (S), все толерантные кодоны были заменены на AGC. Для кодонов, кодирующих тирозин (Y), все толерантные кодоны были заменены на TAC.

ПРИМЕР 10

[174] В этом примере описаны относительные уровни экспрессии PSEN1, управляемые промотором CAG, из двух разных кодон-оптимизированных кодирующих последовательностей PSEN-1 по сравнению с кодирующей последовательностью PSEN1 дикого типа.

[175] Плазмиду pAAV-CAG-MCS (вектор Biolabs) модифицировали путем замены гена устойчивости к ампициллину на ген устойчивости к канамицину. Последовательность промотора CAG представлена в SEQ ID NO:40 и на 98% идентична последовательности SEQ ID NO:23. Затем мы вставили кодирующую PSEN-1 последовательность SEQ ID NO: 39 («CAG-v3.0»; pAT029), SEQ ID NO: 37 («CAG-v1.5»; pAT024) или последовательность дикого типа, кодирующую последовательность PSEN-1 (SEQ ID NO:15; «CAG-нативный»; pAT022), в модифицированную плазмиду и использовали эти плазмиды для трансфекции клеток HEK293, чтобы определить влияние оптимизации кодонов на экспрессию пресенилина-1. Клетки 293 собирали через 48 часов после трансфекции, лизировали с использованием 300 мкл буфера RIPA (50 mM основания/трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% заменителя Nonidet P-40 с добавлением cOmplete™, Мини, коктейль ингибиторов протеазы без ЭДТА, Sigma Aldrich), и собирали супернатант. Концентрацию

общего белка в каждом образце измеряли с помощью белкового анализа THERMO SCIENTIFIC™ PIERCE™ BCA™ в соответствии с инструкциями производителя.

[176] ИФА для обнаружения человеческого белка пресенилина-1 (PS1) в клеточных лизатах проводили с использованием набора для ИФА пресенилина-1 человека RayBio®. Технические повторности анализировали в разведении 1:40 в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с использованием двустороннего t-критерия. На ФИГ. 2 показано, что трансфекция плазмидой, содержащей кодон-оптимизированные SEQ ID NO: 37 или 39, приводила к увеличению экспрессии PS1 по сравнению с кодирующей последовательностью дикого типа, и что уровень экспрессии PSEN-1 из плазмиды, содержащей SEQ ID NO:37, показал статистически значимое увеличение по сравнению с уровнем экспрессии кодирующей последовательности дикого типа (помечено звездочкой $p < 0,05$). Экспрессия PSEN-1 из плазмиды, содержащей SEQ ID NO:39, показала тенденцию к увеличению экспрессии по сравнению с кодирующей последовательностью дикого типа ($p = 0,100$).

[177] Таким образом, синтетические последовательности кДНК, основанные на оптимизации кодонов, исключении динуклеотидов CpG и включении геномных последовательностей, нейрон-специфических промоторных последовательностей и других регуляторных элементов, которые усиливают любой этап генной экспрессии, такой как транскрипция мРНК, процессинг, стабильность и/или трансляцию, например, можно комбинировать в соответствии с желаемыми уровнями экспрессии в нейронах. Сочетание нескольких способов усиления экспрессии полинуклеотидов путем комбинирования элементов, описанных выше, некоторые или все из которых могут оказывать относительно небольшое влияние на продукцию белка в зависимости от типа клеток, расположения нейронов и других факторов, может обеспечить относительно большое увеличение экспрессии кассеты экспрессии нуклеиновой кислоты или векторной молекулы.

ПРИМЕР 11

[178] В этом примере описывается влияние кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности PSEN-1 на активность гамма-секретазы фибробластов пациентов с СБА.

[179] Первичные кожные фибробласты пациентов с семейной болезнью Альцгеймера (СБА), несущие мутации C410Y или G206A в PSEN1, подвергали электропорации с плазмидами, кодирующими фрагмент Notch1 (Notch1ΔE), либо с пустой некодирующей плазмидой (pAAV-CAG-MCS-KanR), либо с кодон-оптимизированным пресенилином-1 человека (hPSEN1v1.5) SEQ ID NO:37.

[180] Как описано в примере 10, плазмиду кДНК pAAV-CAG-MCS (вектор Biolabs) модифицировали для замены гена устойчивости к ампициллину геном устойчивости к канамицину и создания результирующей плазмиды pAAV-CAG-MCS-KanR. Результирующую плазмиду pAAV-CAG-MCS-KanR использовали в качестве контроля или дополнительно модифицировали, чтобы она содержала оптимизированную по

кодонам последовательность, кодирующую пресенилин-1 человека (SEQ ID NO:37), для оценки функциональной активности гамма-секретазы. Плазмида Notch1ΔE кодирует трансмембранный домен и часть внутриклеточного домена Notch1 человека, но лишена всего внеклеточного домена Notch 1. Внутри клеток Notch1ΔE расщепляется гамма-секретазой и может быть обнаружен специфичным антителом (Cell Signaling, № 4147) для расщепленного фрагмента, NICD. Активность гамма-секретазы можно ингибировать с помощью известного ингибитора гамма-секретазы DAPT (Sigma-Aldrich, D5942).

[181] Чтобы определить, является ли кодон-оптимизированная конструкция функциональной, NICD измеряли после обработки hPSEN1v1.5 (3 мкг) по сравнению с некодирующей плазмидой в фибробластах пациентов с СБА, содержащих одну из двух патогенных мутаций PSEN1 (C410Y или G206A). Некоторые фибробласты подвергались воздействию ингибитора DAPT через 24 часа после электропорации и собирали через 48 часов после трансфекции, лизировали с использованием 100 мкл буфера RIPA (50 mM основания/трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% заменителя Nonidet P-40 с добавлением cOmplete™, Мини, коктейль ингибиторов протеазы без ЭДТА, Sigma Aldrich), и собирали супернатант. Концентрацию общего белка в каждом образце измеряли с помощью белкового анализа THERMO SCIENTIFIC™ PIERCE™ BCA™ в соответствии с инструкциями производителя.

[182] Лизаты общего белка из технических повторностей переносили электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану в соответствии с инструкциями производителя. Вестерн-блоты для обнаружения расщепленного Notch (NICD) в клеточных лизатах проводили с использованием рекомендуемых условий. На ФИГ. 3 показано, что трансфекция плазмидой, содержащей SEQ ID NO:37, приводила к увеличению NICD по сравнению с некодирующей конструкцией (пустой) в мутантных фибробластах PSEN1 C410Y и G206A.

ПРИМЕР 12

[183] В этом примере описывается влияние кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности PSEN-1 на уровни Aβ40 в фибробластах пациентов с СБА.

[184] Первичные дермальные фибробласты пациентов с семейной болезнью Альцгеймера (СБА), несущие мутацию C410Y в PSEN 1, подвергали электропорации с плазмидой, кодирующей фрагмент белка-предшественника амилоида (APP) C99, и либо с некодирующей пустой плазмидой (pAAV-CAG-MCS-KanR), либо аналогичной юплазмидой, содержащей кодон-оптимизированную кодирующую последовательность пресенилина-1 человека pAT028 (SEQ ID NO:37), каждая из которых описана выше, чтобы оценить функциональную активность гамма-секретазы. Внутри клеток C99 последовательно расщепляется гамма-секретазой с образованием пептидов Aβ различной длины, которые затем высвобождаются в среду для культивирования клеток.

[185] Чтобы определить функциональность кодон-оптимизированной конструкции, Aβ40 измеряли в культуральной среде клеток после электропорации клеток с указанными

выше плазмидами. Среду для культивирования клеток собирали через 48 часов после трансфекции и анализировали на Аβ40 с помощью ИФА MSD. Данные анализировали с использованием двустороннего t-критерия. На ФИГ. 4 показано, что трансфекция плазмидой, содержащей SEQ ID NO:37, приводила к увеличению продукции Аβ40 по сравнению с некодирующей конструкцией (пустой) в фибробластах С410У СБА с тенденцией к статистической значимости (p=0,23).

ПРИМЕР 13

[186] В этом примере описан синтез различных векторов AAV, содержащих частично оптимизированную по кодонам кодирующую последовательность PSEN-1 по изобретению.

[187] Для получения вирусных векторов AAV, содержащих кодирующие PSEN-1 последовательности по изобретению, мы удалили промотор CAG из плазмиды pAAV-CAG-MCS-KanR, описанной выше, и заменили его различными кассетами экспрессии. Каждая кассета экспрессии содержала другой промотор, оперативно связанный с кодирующей PSEN-1 последовательностью SEQ ID NO:37 и последовательностью полиаденилирования. Кроме того, кассеты дополнительно содержали интрон бета-глобина человека между промотором и кодирующей последовательностью PSEN-1; HA-метка между интроном бета-глобина человека и кодирующей последовательностью PSEN-1, которая может быть удалена перед использованием у субъектов; и либо гормон роста человека, либо геномные буферные последовательности альбумина, следующие за последовательностью полиаденилирования. Последовательность каждой из этих кассет экспрессии и ITR AAV2, которые фланкируют их (которые уже присутствуют в модифицированной плазмиде pAAV-CAG-MCS-KanR), представлены в SEQ ID NO: 41-46.

[188] Для получения самокомплементарного вектора AAV 5'-ITR AAV2 в pAAV-CAG-MCS-KanR модифицируют перед вставкой кассеты экспрессии. Кассета экспрессии для этой конструкции содержала промотор СВА, интрон мелкого мышинового вируса, HA-метку, которую можно удалить перед применением у субъектов, SEQ ID NO:37 и последовательность полиаденилирования β-глобина кролика. Последовательность этой кассеты экспрессии, включающая модифицированные 5'- и нативные 3'-ITR AAV2 из модифицированной плазмиды pAAV-CAG-MCS-KanR, в которую она была вставлена, представлена в SEQ ID NO:47.

[189] Каждую из полученных векторных геномных плазмид, содержащих кассету экспрессии, использовали для создания рекомбинантных векторов AAV с использованием метода тройной плазмидной трансфекции (Xiao and Samulski, J Virol 72: 2224-2232, 1998). В этом методе использовалась плазида гер и сар, специфичная для серотипа AAV, специфичная для интересующего серотипа, а также плазида ДНК векторного генома, но исключалось использование Ad-инфекции за счет предоставления основных Ad-генов на третьей плазмиде. Транзиторная трансфекция адгезивных клеток HEK293 мультиплазмидами является широко используемым методом получения rAAV (Grimm et al., Hum Gene Ther 9: 2745-2760, 1998; Matsushita et al., Gene Ther 5: 938-945, 1998) и

может быть использована для создания этих рекомбинантных векторов AAV. Частицы AAV могут быть приготовлены в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в 10 мМ фосфата натрия, 180 мМ NaCl с 0,001% плюроновой кислоты (F-68) при pH около 7,4.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1

>NM_000021.4 Пресенилин-1 (PSEN1) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, мРНК. Кодирующая последовательность подчеркнута

GGAAACAAAACAGCGGCTGGTCTGGAAGGAACCTGAGCTACGAGCCGCGGC
 GGCAGCGGGGCGGCGGGGAAGCGTATACCTAATCTGGGAGCCTGCAAGTGACAACA
 GCCTTTGCGGTCCTTAGACAGCTTGGCCTGGAGGAGAACACATGAAAGAAAGAACC
 TCAAGAGGCTTTGTTTTCTGTGAAACAGTATTTCTATACAGTTGCTCCAATGACAGA
GTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCT
GAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGAC
AGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTATCTAATGGACGACCCCAGGGTAACTC
CCGGCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGAAATAT
GGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTC
GTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTAT
ACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCT
GAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTG
TATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGT
TGCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGC
TGTGGACTACATTAAGTGTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGAT
TTCCATTCAGTGGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAG
TGCCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCAT
CTTGGCTGTGATTTCAAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTT
CGTATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATT
TACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAAGGAGACCCGGAAGCTCA
AAGGAGAGTATCCAAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCA
CAAGACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCA
GAGGGACAGTCATCTAGGGCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCA
GGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAAC
TTGGATTGGGAGATTTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAG
CCAGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGT
GCCTTACATTATTAATCCTTGCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTC
CATCACCTTTGGGCTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTATG
GACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAGCATATTTGCGGTTAGAATCCCATG
GATGTTTCTTCTTTGACTATAACAAAATCTGGGGAGGACAAAGGTGATTTTCTCTGTG
TCCACATCTAACAAGTCAAGATTTCCGGCTGGACTTTTGCAGCTTCCTTCCAAGTC
TTCTGACCACCTTGCATAATTGGACTTTGGAAGGAGGTGCCTATAGAAAACGATTT
TGAACATACTTCATCGCAGTGGACTGTGTCCCTCGGTGCAGAAACTACCAGATTTGA

GGGACGAGGTCAAGGAGATATGATAGGCCCGGAAGTTGCTGTGCCCATCAGCAGC
TTGACGCGTGGTCACAGGACGATTTCACTGACACTGCGAACTCTCAGGACTACCGTT
ACCAAGAGGTTAGGTGAAGTGGTTTAAACCAAACGGAACCTTTCATCTTAAACTAC
ACGTTGAAAATCAACCCAATAATTCTGTATTA ACTGAATTCTGAACTTTTCAGGAGG
TACTGTGAGGAAGAGCAGGCACCAGCAGCAGAATGGGGAATGGAGAGGTGGGCAG
GGGTTCCAGCTTCCCTTTGATTTTTTGCTGCAGACTCATCCTTTTTTAAATGAGACTTG
TTTTCCCCTCTCTTTGAGTCAAATATGTAGATTGCCTTTGGCAATTCTTCTTCT
CAAGCACTGACACTCATTACCGTCTGTGATTGCCATTTCTTCCCAAGGCCAGTCTGA
ACCTGAGGTTGCTTTATCCTAAAAGTTTTAACCTCAGGTTCCAAATTCAGTAAATTTT
GGAAACAGTACAGCTATTTCTCATCAATTCTCTATCATGTTGAAGTCAAATTTGGAT
TTTCCACCAAATTCGAATTTGTAGACATACTTGTACGCTCACTTGCCCCAGATGCCT
CCTCTGTCCTCATTCTTCTCTCCCACACAAGCAGTCTTTTTTCTACAGCCAGTAAGGCA
GCTCTGTCGTGGTAGCAGATGGTCCCATTATTCTAGGGTCTTACTCTTTGTATGATGA
AAAGAATGTGTTATGAATCGGTGCTGTCAGCCCTGCTGTCAGACCTTCTTCCACAGC
AAATGAGATGTATGCCCAAAGACGGTAGAATTAAGAAGAGTAAAATGGCTGTTGA
AGCACTTTCTGTCCTGGTATTTTGTTTTTGCTTTTGCCACACAGTAGCTCAGAATTTG
AACAAATAGCCAAAAGCTGGTGGTTGATGAATTATGAACTAGTTGTATCAACACAA
AGCAAGAGTTGGGGAAAGCCATATTTAACTTGGTGAGCTGTGGGAGAACCTGGTGG
CAGAAGGAGAACCAACTGCCAAGGGGAAAGAGAAGGGGCCTCCAGCAGCGAAGGG
GATACAGTGAGCTAATGATGTCAAGGAGGAGTTTCAGGTTATTCTCGTCAGCTCCAC
AAATGGGTGCTTTGTGGTCTCTGCCC GCGTTACCTTTCCTCTCAATGTACCTTTGTGT
GAACTGGGCAGTGGAGGTGCCTGCTGCAGTTACCATGGAGTTCAGGCTCTGGGCAG
CTCAGTCAGGCAAACACACAAACAGCCATCAGCCTGTGTGGGCTCAGGGCACCTC
TGGACAAAGGCTTGTGGGGCATAACCTTCTTTACCACAGAGAGCCCTTAGCTATGCT
GATCAGACCGTAAGCGTTTATGAGAACTTAGTTTCCTCCTGTGGCTGAGGAGGGGC
CAGCTTTTTCTTCTTTTGCCTGCTGTTTTCTCTCCAATCTATGATATGATATGACCTG
GTTTGGGGCTGTCTTTGGTGTTTAGAATATTTGTTTTCTGTCCCAGGATATTTCTTAT
AAGAACCTAACTTCAAGAGTAGTGTGCGAGTACTGATCTGAATTTAAATTA AAAATTG
GCTTATATTAGGCAGTCACAGACAGGAAAAATAAGAGCTATGCAAAGAAAGGGGG
ATTTAAAGTAGTAGGTTCTATCATCTCAATTCATTTTTTTCCATGAAATCCCTTCTTC
CAAGATTCATTCCCTCTCTCAGACATGTGCTAGCATGGGTATTATCATTGAGAAAGC
ACAGCTACAGCAAAGCCACCTGAATAGCAATTTGTGATTGGAAGCATTCTTGAGGG
ATCCCTAATCTAGAGTAATTTATTTGTGTAAGGATCCCAAATGTGTTGCACCTTTCAT
GATACATTTCTTCTCTGAAGAGGGTACGTGGGGTGTGTGTATTTAAATCCATCCTAT
GTATTACTGATTGTCCTGTGTAGAAAGATGGCAATTATTCTGTCTCTTTCTCCAAGTT
TGAGCCACATCTCAGCCACATTGTTAGACAGTGTACAGAGAACCTATCTTTCCTTTTT
TTTTTTTTAAAGGACAGGATTTTGCTGTGTTGCCAGGCTAGACTTGA ACTCCTGGGC
TCAAGTAATCCACCTCAGCCTGAGTAGCTGAGACTACAGCCATCTTATTTCTTTAA
ATCATT CATCTCAGGCAGAGAACTTTTCCCTCAAACATTCTTTTTAGAAATTAGTTCAG
TCATTCCCTAAAACATCCAAATGCTAGTCTTCCACCATGAAAAATAGATTGTC ACTGG

AAAGAACAGTAGCAATTTCCATAAGGATGTGCCTTCACTCACACGGGACAGGCGGT
GGTTATAGAGTCGGGCAAACCAGCAGTAGAGTATGACCAGCCAAGCCAATCTGCT
TAATAAAAAGATGGAAGACAGTAAGGAAGGAAAGTAGCCACTAAGAGTCTGAGTC
TGACTGGGCTACAGAATAAAGGGTATTTATGGACAGAATGTCATTACATGCCTATGG
GAATACCAATCATATTTGGAAGATTTGCAGATTTTTTTTCAGAGAGGAAAGACTCAC
CTTCCTGTTTTTGGTTCTCAGTAGGTTTCGTGTGTGTTCCCTAGAATCACAGCTCTGACT
CCAAATGACTCAATTTCTCAATTAGAAAAAGTAGAAGCTTTCTAAGCAACTTGGAAG
AAAACAGTCATAAGTAAGCAATTTGTTGATTTTACTACAGAAGCAACAACCTGAAGA
GGCAGTGTTTTTACTTTCAGACTCCGGGATTTCCATTCTGTAGTCTCTCTGCTTTTAA
AAACCCTCCTTTTGCAATAGATGCCCAAACAGATGATGTTTATTACTTGTTATTTACG
TGGCCTCAGACAGTGTATGTATTCTCGATATAACTTGTAGAGTGTGAAATATAAGTT
TAACTACCAAATAAGGTCTCCCAGGGTTAGATGACTGCGGGAAGCCTTTGATCCCAA
CCCCAAGGCTTTGTATATTTGATCATTGTGTATCTAACCTGGAAGAAAAAGAGCT
CAGAAACCACTATGAAAAAATTTGTTCAAGTGTCTGTGTTCCCGTAGGTTCTGGA
GTCTGAGGATGCAAAGATGAATAAGATAAATTCTCAGAATGTAGTTATAATCTCTTG
TTTTCTGGTATATGCCATCTTTCTTTAACTTCTCTAAAATATTGGGTATTTGTCAAAT
AACCCTTTTAAACAGTTACCATTACTGAGGGCTTATACATTGGTGTTATAAAAGTGA
CTTGATTCAGAAATCAATCCATTCAAGTAAAGTACTCCTTCTCTAAATTTGCTGTTATG
TCTATAAGGAACAGTTTGACCTGCCCTTCTCCTCACCTCCTCACCTGCCTTCCAACAT
TGAATTTGGAAGGAGACGTGAAAATTGGACATTTGGTTTTGCCCTTGGGCTGGAAAC
TATCATATAATCATAAGTTTGAGCCTAGAAGTGATCCTTGTGATCTTCTCACCTCTTT
AAATTCCCACAACACAAGAGATTA AAAACAGAGGTTTCAGCTCTTCATAGTGC GTTG
TGAAATGGCTGGCCAGAGTGTACCAACAAAGCTGTCATCGGGCTCACAGCTCAGAG
ACATCTGCATGTGATCATCTGCATAGTCCTCTCCTCTAACGGGAAACACCTCAGATT
TGCATATAAAAAAGCACCCCTGGTGCTGAAATGAACCCCTTTCTTGAACATCAAAGCT
GTCTCCCACAGCCTTGGGCAGCAGGGTGCCTCTTAGTGGATGTGCTGGGTCCACCCT
GAGCCCTGACATGTGGTGGCAGCATTGCCAGTTGGTCTGTGTGTCTGTGTAGCAGGG
ACGATTTCCAGAAAGCAATTTTCCTTTTGAAATACGTAATTGTTGAGACTAGGCAG
TTTCAAAGTCAGCTGCATATAGTAGCAAGTACAGGACTGTCTTGTTTTTTGGTGTCTT
GGAGGTGCTGGGGTGAGGGTTTCAGTGGGATCATTTACTCTCACATGTTGTCTGCCT
TCTGCTTCTGTGGACACTGCTTTGTAATTCAGACAGACTGTGAATACACCTTTT
TTATAAATACCTTTCAAATTCTTGGTAAGATATAATTTTGATAGCTGATTGCAGATTT
TCTGTATTTGTCAGATTAATAAAGACTGCATGAATCCA

SEQ ID NO:2

> Промотор SST человека

acactaaaatgtagagtatgatgacagatggagtgctgggtacattgtgtgcatttaagggatagtgatttgctcttaaga
gctgagtgttgagcctctgttgtgtgaattgagtgatgtgtgggagtgaaattgtggaatgtgatgctatagcactgagtgaaaataa
aagattgataaatcgtggggcatgtggaattgtgtgacctgtgcgtgtgcaglatTTTTTTTTtaagtaagccacttagatctgtcacctcc
cctgtctctgtgattgattttgcgaggctaattgtgcgtaaaagggctggtgagatctgggggagcctcctagcctgacgtcagagagaga
gtttaaacaagaggagacgggtgagagcacacaagccgcttaggagcgaggttcggagccatcgtgctgctgctgatccgcgcta

gagtttgaccagcc

SEQ ID NO:3

> Промотор NPY человека

ttttggccaggggatgtggcttgactggagagaaaggagataaggatgtaaacacatgtagggcatatccccctatTTTTatt
ctctgaatccttaaccctcagaataaagttcttattcttgagaatcaatgacattatcttaagctaaattaatcaagcctccacagtgtctctctcaa
tagtggtgtggccttctagaagtaattttcccaaatcagtgatacatTTAagttcagattTTAattgatatgaatctgtgatacactctaaaat
aagattTTTTattgaaaagtgactgtaactttcccttattctaggaagagctctaagttagaagatgttttgacttttaccgaaggctgtgtcttg
taagcccccgagcaactctgagagccttgattttgtgtcctcagcatatgtttgtgtaatacagaaagagaagcagttgccaagtgaag
ggatgttggtctccaaaattatagttgatccacaacacacacatacatgcaaaggattgtttgcttcacggTTTTgatatttaattcaat
gctgttggaacagcacaaaaactaagtgtcagtttaacagaatcactgtccttttagcattaaaataacatggaacttaatgctttaatttcccaa
catgcctttttattagaagattcagacttttattcatttagaaataaaatgccattttatttagaaagatacaggagcattcattcacggaacttc
agatctcagtcactgcataaaatcttgatcctgtaataatagttctgtatcttgcatattcattcaacaggttaacgcgatgagcaaattaatgtt
catcgttttaaacgtttctttaatcagaaccacattctcaacgtaattgaacgtacataggactatacaagggttagtaataagacaga
aactgttgccttaaccaccgtcactttgga

SEQ ID NO:4

> ИНСУЛЯТОР ХРОМАТИНА HS4

cagcctaaagctttttccccgtatccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgtatccccgt
gccaccttccccgtgccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatcggggggagcggccggaccggagcggagccccgggc
ggctcgtgtgtccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtccccgtgagctc

SEQ ID NO:5

> КОНСЕНСУСНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ KOZAK

ссacc

SEQ ID NO:6

>человеческий PSEN1, при этом все толерантные, непредпочтительные кодоны
заменены на наиболее предпочтительные синонимичные кодоны. Измененные кодоны
указаны строчными буквами:

ATGACAGAGTTACCTGCAcctTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAG
GACAACCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGA
GCACAACGACAGACGGAGCctgGGCCACCCTGAGCCAActgTCTAATGGAagaCCCCAGG
GTAАCTCCCGGCAGGTGGTGGAGcagGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACAActgA
AATATGGCGCCAAGcaccGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGT
GGTCGTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAAT
CTATACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAA
TTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGT
TCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGctgATTATATCATCTctgTT
GctgCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACctgGGGGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGC
TGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTggcGTGGTGGGAATGATT
TCCATTCACTGGAAAaggcCActgagaCTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCC
CTCATGGCCCTGGTGTTTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTgccTGGCTCATCTTGGC
TGTGATTTCAAGTGTATGATTTAGTGGCTGTTctgTGTcctAAAGGTCCAActgCGTATGCTG

gtgGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAaccctgTTTCCAGCTCTCATTTACTCCTCAACA
 ATGGTGTGGctgGTGAATATGGCAGAAGGAGACcctGAAGCTCAAAGGAGAggtTCCAA
 AAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCAcagGACACTGTTGCAGA
 GAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTcacctgGGG
 CCTcacCGCTCTACACCTGAGTCAagaGCTGCTGTCCAGGAActgTCCAGCAGTATCCTC
 GCTggcGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAACTTGGATTGGGAGATTTTCAATTTTC
 TACAGTGTCTGGTTggcAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGGAACACAACC
 ATAGCCTGTTTCGTAGCCatcTTAATTggcctgTGCCTTACActgctgCTCctgGCCATTTTCAA
 GAAAGCActgCCAGCTctgCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCAC
 AGATTATctgggtgCAGCCTTTTATGGACcagctgGCATTcaccagTTTTATATCtaa

SEQ ID NO:7

> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КДНК PSEN1, в которой удалены все динуклеотиды CpG, все толерантные кодоны заменены на наиболее предпочтительные синонимичные кодоны, а некоторые нетолерантные кодоны заменены в результате удаления динуклеотидов CpG. Измененные кодоны указаны строчными буквами; измененные нетолерантные кодоны указаны строчными буквами и подчеркнуты.

ATGACAGAGTTACCTGCACcaTTGTCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAG
 GACAACCACCTGAGCAATACTGTAagaAGCCAGAATGACAATAGAGAAagaCAGGAG
 CACaatGACAGAagaAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTATCTAATGGAagaCCCCAGGGT
 AACTCCagaCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGAA
 ATATggtGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTggt
 tGTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCagaAAGGATGGGCAGCTAATCTAT
 ACCCCATTACAGAAGATactGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGA
 ATGCTGCCATCATGATCAGTGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTGTA
 TAAATACAGGTGCTATAAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTG
 CTGTTttcTTTTCAATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTTTAAACCTATAaatGTTGCTGTGG
 ACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCAT
 TCACTGGAAAGGTCCACTTagaCTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCCCTC
 ATGGCCCTGGTGTTTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTgcccTGGCTCATCTTGGCTGT
 GATTTCAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTcccAAAGGTCCACTTagaATGCTGGT
 TGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAaccCTTTTTCCAGCTCTCATTTACTCCTCAACA
 ATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAAGGAGACccaGAAGCTCAAAGGAGAGTATCC
 AAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCAACAAGACACTGTTGC
 AGAGAATGATGATggtGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATCT
 AGGGCCTCATaggTCTACACCTGAGTCAagaGCTGCTGTCCAGGAACTTTCCAGCAGTA
 TCctgGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAACTTGGATTGGGAGATTTCA
 TTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGGAACA
 CAACCATAGCCTGTtttGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTATTAATCCTTG
 CCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTT
 CTAATTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAA

TTTTATATCTAG

SEQ ID NO:8

> ГИБРИД ГЕНОМНОЙ/КДНК ГЕНА PSEN1

cccAGATCTgacaacagcctttgcggctcttagacagcttggcctggaggagaacacatgaaagaaaggtttctgtctaatgtaaatctatgaaagtgtttttataacagtataattgtagtgcaacaagttctgtttttctttcccttttcagaacctcaaggagctttgtttctgtgaaacagatattctatacagttgccaccatgacagagttacctgcaccgttgctacttccagaatgcacagatgtctgaggacaaccacctgagcaactgtacgtgaccaggtacagtgctcgtctgaaactgctttgccagactggattcacttatcatctcccctcacctctgagaaatctgagggggcttaggcaggtttctctactttttagaactcatagtgacgggtctgtttaaaccaggttaaccgttaccttgattctgctgagatctgattfactgaaatgttttctgtgcttatagaatgacaatagagaacggcaggagcacaacgacagacggagccttggccacctgagccattatctaattggacgacccagggtaactcccggcaggtggaggcaagatgaggaagaagatgaggagctgacattgaaatggegccaagcatgtgatcatgctctttgtccctgtactctctgcatgggtggctgtggctaccattaagtcatcagctttataccggaggatgggcagctgtacgtatgagtttgttttatttctcaaagccagtggtgctttctttacagcatgtcatcaccttgaaggcctctgactgaaggggcatgacttgaaltaagaaaaaagaattctgtttggaggtggtaattgtggttgatctccattaacactgacctagggtttgtgtttttattgtagaatctataccctacacagaagataccgagactgtggccagagagcctgcaactcaattctgaatgctgccatcatgactgctcattgtgtcatgactatcctcctgggtgttctgtataatacaggtgctataaggctcatccatgcttattatcatctctattgtgctgttctttttcattcatttacttgggggaagtgtttaaactataacgttctgtgtgactacattactgttgcactcctgatctggaatttgggtgtgtgggaatgatttccattcactggaaaggtccacttgcactccagcagccatctcattatgattagtcacctatggcctgtgttatcaaglacctccctgaatggactgcgtggctcatctggctgtgattcagtatatgatttagtggctgtttgttccgaaaggtccactcgtatctgttgtaaacagctcaggagagaaatgaaacgcttttccagctctcatttactcctcaacaatgggtgtgttggtgaaatggcagaaggagacccggaagctcaaaggagagatccaaaaattccaagtataatgcagaaagcacagaaaggagtcacaagacactgttcagagaatgatgatggcgggtcagtgaggaatgggaagccagagggacagtcacttagggcctcatcgtctacactgagtcacagactgctgtccaggaactttccagcagatcctcgtgtgaagaccagaggaaggaggagtaaaactggattgggagatttcatttctacagtgtctgtgtgtaaagcctcagcaacagccagtgagactggaacacaacctagcctgtttctgtagccatattaattggtttgtccttacattactcctttgccattttcaagaaagcattgccagctctccaatctccatcacctttgggcttgtttctactttgccacagattatctgtacagcctttatgga ccaattagcattccatcaattttatatctagcataGTCGACc

SEQ ID NO:9

> ЭЛЕМЕНТ СТАБИЛЬНОСТИ МРНК MALAT1

tagggtcatgaaggttttctttcttgagaaaacaacacgtattgtttctcaggtttgcttttggccttttctagcttaaaaaaaaaaa aaagcaaaagatgctggtggtggcactcctggttccaggacggggttcaaatccctgcggcgtctttgctttgact

SEQ ID NO:10

> 3'-ФЛАНКИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НАТИВНОЙ РНК PSEN1

GGAAACAAAACAGCGGCTGGTCTGGAAGGAACCTGAGCTACGAGCCGCGGC
GGCAGCGGGGCGGCGGGGAAGCGTATACСТААТСТGGGAGCCTGCAAGTGACAACA
GCSTTTGCGGTCSTTAGACAGCTTGGCCTGGAGGAGAACACATGAAAGAAAGAACC
TCAAGAGGCTTTGTTTTCTGTGAAACAGTATTTСТАТАСAGTTGCTССА

SEQ ID NO: 11

> 5'-ФЛАНКИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НАТИВНОЙ МРНК PSEN1

САТАТТТGCGGTTAGAATCCCATGGATGTTTCTTCTTTGACTАТААСААААТC
TGGGGAGGАСААAGGTGATTTTCCTGTGTCCACATСТААСААAGTCAAGATTCCCGG
CTGGACTTTTGCAGCTTCSTTCCAAGTCTTCTTGACCACCTTGCACTATTGGACTTTG

GAAGGAGGTGCCTATAGAAAACGATTTTGAACATACTTCATCGCAGTGGACTGTGTC
CCTCGGTGCAGAACTACCAGATTTGAGGGACGAGGTCAAGGAGATATGATAGGCC
CGGAAGTTGCTGTGCCCCATCAGCAGCTTGACGCGTGGTCACAGGACGATTTCACTG
ACACTGCGAACTCTCAGGACTACCGTTACCAAGAGGTTAGGTGAAGTGGTTTAAAC
CAAACGGAACTCTTCATCTTAAACTACACGTTGAAAATCAACCCAATAATTCTGTAT
TAACTGAATTCTGAACTTTTCAGGAGGTACTGTGAGGAAGAGCAGGCACCAGCAGC
AGAATGGGGAATGGAGAGGTGGGCAGGGGTTCCAGCTTCCCTTTGATTTTTTGTGTC
AGACTCATCCTTTTTAAATGAGACTTGTTTTCCCCTCTCTTTGAGTCAAGTCAAATAT
GTAGATTGCCTTTGGCAATTCTTCTTCAAGCACTGACACTCATTACCGTCTGTGAT
TGCCATTTCTTCCCAAGGCCAGTCTGAACCTGAGGTTGCTTTATCCTAAAAGTTTTAA
CCTCAGGTTCCAAATTCAGTAAATTTTGAAACAGTACAGCTATTTCTCATCAATTCT
CTATCATGTTGAAGTCAAATTTGGATTTTCCACCAAATTCTGAATTTGTAGACATACT
TGTACGCTCACTTGCCCCAGATGCCTCCTCTGTCCTCATTCTTCTCTCCACACAAGC
AGTCTTTTTCTACAGCCAGTAAGGCAGCTCTGTCGTGGTAGCAGATGGTCCCATTAT
TCTAGGGTCTTACTCTTTGTATGATGAAAAGAATGTGTTATGAATCGGTGCTGTCAG
CCCTGCTGTCAGACCTTCTTCCACAGCAAATGAGATGTATGCCCAAAGACGGTAGAA
TTAAAGAAGAGTAAAATGGCTGTTGAAGCACTTTCTGTCCTGGTATTTTTGTTTTTGT
TTTGCCACACAGTAGCTCAGAATTTGAACAAATAGCCAAAAGCTGGTGGTTGATGA
ATTATGAACTAGTTGTATCAACACAAAGCAAGAGTTGGGGAAAGCCATATTTAACTT
GGTGAGCTGTGGGAGAACCTGGTGGCAGAAGGAGAACCAACTGCCAAGGGGAAAG
AGAAGGGGCCTCCAGCAGCGAAGGGGATACAGTGAGCTAATGATGTCAAGGAGGA
GTTTCAGGTTATTCTCGTCAGCTCCACAAATGGGTGCTTTGTGGTCTCTGCCCCGCGT
ACCTTTCCTCTCAATGTACCTTTGTGTGAACTGGGCAGTGGAGGTGCCTGCTGCAGT
TACCATGGAGTTCAGGCTCTGGGCAGCTCAGTCAGGCAAAACACACAAACAGCCAT
CAGCCTGTGTGGGCTCAGGGCACCTCTGGACAAAGGCTTGTGGGGCATAACCTTCTT
TACCACAGAGAGCCCTTAGCTATGCTGATCAGACCGTAAGCGTTTATGAGAACTTA
GTTTCTCCTGTGGCTGAGGAGGGGCCAGCTTTTTCTTCTTTTGCCTGCTGTTTTCTCT
CCCAATCTATGATATGATATGACCTGGTTTGGGGCTGTCTTTGGTGTTTAGAATATTT
GTTTTCTGTCCCAGGATATTTCTTATAAGAACCTAACTTCAAGAGTAGTGTGCGAGT
ACTGATCTGAATTTAAATTTAAATTTGGCTTATATTAGGCAGTCACAGACAGGAAAA
ATAAGAGCTATGCAAAGAAAGGGGGATTTAAAGTAGTAGGTTCTATCATCTCAATT
CATTTTTTTCCATGAAATCCCTTCTTCCAAGATTCATTCCCTCTCTCAGACATGTGCT
AGCATGGGTATTATCATTGAGAAAGCACAGCTACAGCAAAGCCACCTGAATAGCAA
TTTGTGATTGGAAGCATTCTTGAGGGATCCCTAATCTAGAGTAATTTATTTGTGTAA
GGATCCCAAATGTGTTGCACCTTTCATGATACATTTCTTCTCTGAAGAGGGTACGTG
GGGTGTGTGTATTTAAATCCATCCTATGTATTACTGATTGTCTGTGTAGAAAGATG
GCAATTATTCTGTCTCTTTCTCCAAGTTTGAGCCACATCTCAGCCACATTGTTAGACA
GTGTACAGAGAACCTATCTTTCCTTTTTTTTTTTTTTAAAGGACAGGATTTTGTGCTGT
TGCCCAGGCTAGACTTGAACCTCCTGGGCTCAAGTAATCCACCTCAGCCTGAGTAGCT
GAGACTACAGCCCATCTTATTTCTTTAAATCATTATCTCAGGCAGAGAACTTTTCCC

TCAAACATTCTTTTTAGAAATTAGTTCAGTCATTCCCTAAAACATCCAAATGCTAGTCTT
 CCACCATGAAAAATAGATTGTCACTGGAAAGAACAGTAGCAATTTCCATAAGGATG
 TGCCTTCACTCACACGGGACAGGCGGTGGTTATAGAGTCGGGCAAACCAGCAGTA
 GAGTATGACCAGCCAAGCCAATCTGCTTAATAAAAAAGATGGAAGACAGTAAGGAAG
 GAAAGTAGCCACTAAGAGTCTGAGTCTGACTGGGCTACAGAATAAAGGGTATTTAT
 GGACAGAATGTCATTACATGCCTATGGGAATACCAATCATATTTGGAAGATTTGCAG
 ATTTTTTTTTCAGAGAGGAAAGACTCACCTTCCTGTTTTTGGTTCTCAGTAGGTTCTGT
 TGTGTTCTTAGAATCACAGCTCTGACTCCAAATGACTCAATTTCTCAATTAGAAAAA
 GTAGAAGCTTTCTAAGCAACTTGAAGAAAACAGTCATAAGTAAGCAATTTGTTGA
 TTTTACTACAGAAGCAACAACCTGAAGAGGCAGTGTTTTTACTTTCAGACTCCGGGAT
 TCCCATTCTGTAGTCTCTCTGCTTTTAAAAACCCTCCTTTTGCAATAGATGCCCAAAC
 AGATGATGTTTATTACTTGTATTTACGTGGCCTCAGACAGTGTATGTATTCTCGATA
 TAACTTGTAGAGTGTGAAATATAAGTTTAACTACCAAATAAGGTCTCCCAGGGTTAG
 ATGACTGCGGGAAGCCTTTGATCCCAACCCCAAGGCTTTGTATATTTGATCATTG
 TGATCTAACCTGGAAGAAAAAGAGCTCAGAAACCACTATGAAAAAATTTGTTTCAG
 TGTTTTCTGTGTTCCCGTAGGTTCTGGAGTCTGAGGATGCAAAGATGAATAAGATAA
 ATTCTCAGAATGTAGTTATAATCTCTTGTTTTTCTGGTATATGCCATCTTTCTTTAACTT
 CTCTAAAATATTGGGTATTTGTCAAATAACCACTTTTAAACAGTTACCATTACTGAGG
 GCTTATACATTGGTGTATAAAAAGTGACTTGATTCAGAAATCAATCCATTCAGTAAA
 GACTCCTTCTCTAAATTTGCTGTTATGTCTATAAGGAACAGTTTGACCTGCCCTTCT
 CCTCACCTCCTCACCTGCCTTCCAACATTGAATTTGGAAGGAGACGTGAAAATTGGA
 CATTTGGTTTTGCCCTTGGGCTGGAAACTATCATATAATCATAAGTTTGAGCCTAGA
 AGTGATCCTTGTGATCTTCTCACCTCTTTAAATTCCCACAACACAAGAGATTA AAAA
 CAGAGGTTTCAGCTCTTCATAGTGC GTTGTGAAATGGCTGGCCAGAGTGTACCAACA
 AAGCTGTCATCGGGCTCACAGCTCAGAGACATCTGCATGTGATCATCTGCATAGTCC
 TCTCCTCTAACGGGAAACACCTCAGATTTGCATATAAAAAAGCACCTGGTGCTGAA
 ATGAACCCCTTTCTTGAACATCAAAGCTGTCTCCACAGCCTTGGGCAGCAGGGTGC
 CTCTTAGTGGATGTGCTGGGTCCACCCTGAGCCCTGACATGTGGTGGCAGCATTGCC
 AGTTGGTCTGTGTGTCTGTGTAGCAGGGACGATTTCCAGAAAGCAATTTTCTTTT
 GAAATACGTAATTGTTGAGACTAGGCAGTTTCAAAGTCAGCTGCATATAGTAGCAA
 GTACAGGACTGTCTTGTTTTTTGGTGTCTTGGAGGTGCTGGGGTGAGGGTTTCAGTG
 GGATCATTTACTCTCACATGTTGTCTGCCTTCTGCTTCTGTGGACACTGCTTTGTA
 CTAAATTCAGACAGACTGTGAATACACCTTTTTTATAAATACCTTTCAAATTTGGTAA
 GATATAATTTTGATAGCTGATTGCAGATTTTCTGTATTTGTCAGATTAATAAAGACTG
 CATGAATCCA

SEQ ID NO: 12

>XP_011535274.1 изоформа X1 пресенилина-1 человека [467 аминокислот]
 MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSENTRVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNGRPQGN
 SRQVVEQDEEEDLTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMVVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIYTP
 FTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLISSLLLLFFFSFI

YLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVGMIHVKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIK
 YLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYSSTMVWLVN
 MAEGDPEAQRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEEWEAQRDShLGPHRSTP
 ESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGDFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILI
 GLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVQPFMDQLAFHQFYI

SEQ ID NO: 13

>Ген (кДНК) PSEN1 человека, 463 аминокислоты, изоформа X2 (GenBank NM_007318.3)

atgacagagttacctgcaccgtgtcctacttccagaatgcacagatgtctgaggacaaccacctgagcaataactaatgacaatag
 agaacggcaggagcacaacgacagacggagcctggccacctgagccattatctaatggacgaccccagggttaactcccggcagggtg
 gtggagcaagatgaggaagaagatgaggagctgacattgaaatggcgccaagcatgtgatcatgctctttgtccctgtgactctctgat
 ggtggtggctgtggctaccattaagtcagtcagctttataccggaaggatgggcagctaatctataccccattcacagaagataccgagac
 tgtggccagagagccctgactcaattctgaatgtgccatcatgatcagtgctattgttgcatactatcctctggtggtctgtataaata
 caggtgctataaggtcatccatgctgcttattatcatctctattgttgccttttttcttcttacttgggggaagtgttaaacctata
 acgttgcctgtggactacattactgttgcactcctgatctggaatttgggtggtgggaatgattccattcactggaaggccacttcgactcc
 agcaggcatalctcattatgattagtgcctcatggccctggtgtttatcaagtacctcctgaatggactgcgtggctcatcttggctgtgattt
 cagtatatgatttagtggtgtttgtgtccgaaaggtccacttcgatgtggtgaaacagctcaggagagaaatgaaacgcttttccagctc
 tcttactcctcaacaatggtgtggtggtgaaatggcagaaggagaccggaaagctcaaggagagatccaaaaattccaagtataatg
 cagaaagcacagaaagggagtcacaagacactgttcagagaatgatgatggcgggttcagtgaggaatgggaagcccagagggaca
 gtcactagggcctcatcgtctacacctgagtcacgagctgctgtccaggaactttccagcagatcctcgtggtgaagaccagaggaa
 aggggagtaaaacttgattgggagatttctttctacagtgttctggttgtaaagcctcagcaacagccagtgagactggaacacaacc
 atagcctgtttcgtagecatattaattggtttgtgccttacattactccttgcattttcaagaaagcattgccagctcttccaatctccatcacct
 ttgggctgttttctactttgccacagattatctgtacagcctttatggaccaattagcattccatcaattttatatctag

SEQ ID NO: 14

> изоформа X2 пресенилина-1 [463 аминокислоты]

MTELPAPLSYFQNAQMSEDNHLSNTNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNGRPQGN
 SRQVVEQDEEEDDEELTKYGAKHVIMLFVPTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIYTPF
 TEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIVVMTILLVPLYKYRCYKVIHAWLISSLLLLFFFSFI
 YLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVGMIHVKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIK
 YLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFPALIYSSTMVWLVN
 MAEGDPEAQRRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEEWEAQRDShLGPHRSTP
 ESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGDFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILI
 GLCLTLLLLAIFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVQPFMDQLAFHQFYI

SEQ ID NO:15

> Кодирующая последовательность изоформы X1 пресенилина-1 с подчеркнутыми нетолерантными кодонами

ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG
ATG TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT GAC
AAT AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT
GAG CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG

GAG CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC
 AAG CAT GTG ATC ATG CTC TTT GTC CCT GTG ACT CTC TGC ATG GTG GTG GTC
 GTG GCT ACC ATT AAG TCA GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG CAG CTA
ATC TAT ACC CCA TTC ACA GAA GAT ACC GAG ACT GTG GGC CAG AGA GCC
CTG CAC TCA ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATC AGT GTC ATT GTT GTC ATG
ACT ATC CTC CTG GTG GTT CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT AAG GTC ATC CAT
GCC TGG CTT ATT ATA TCA TCT CTA TTG TTG CTG TTC TTT TTT TCA TTC ATT
 TAC TTG GGG GAA GTG TTT AAA ACC TAT AAC GTT GCT GTG GAC TAC ATT ACT
GTT GCA CTC CTG ATC TGG AAT TTT GGT GTG GTG GGA ATG ATT TCC ATT CAC
TGG AAA GGT CCA CTT CGA CTC CAG CAG GCA TAT CTC ATT ATG ATT AGT GCC
CTC ATG GCC CTG GTG TTT ATC AAG TAC CTC CCT GAA TGG ACT GCG TGG CTC
ATC TTG GCT GTG ATT TCA GTA TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCG AAA
GGT CCA CTT CGT ATG CTG GTT GAA ACA GCT CAG GAG AGA AAT GAA ACG CTT
TTT CCA GCT CTC ATT TAC TCC TCA ACA ATG GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA
GAA GGA GAC CCG GAA GCT CAA AGG AGA GTA TCC AAA AAT TCC AAG TAT
 AAT GCA GAA AGC ACA GAA AGG GAG TCA CAA GAC ACT GTT GCA GAG AAT
 GAT GAT GGC GGG TTC AGT GAG GAA TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT
 CTA GGG CCT CAT CGC TCT ACA CCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT
TCC AGC AGT ATC CTC GCT GGT GAA GAC CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA
CTT GGA TTG GGA GAT TTC ATT TTC TAC AGT GTT CTG GTT GGT AAA GCC TCA
GCA ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACA ACC ATA GCC TGT TTC GTA GCC
 ATA TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA TTA TTA CTC CTT GCC ATT TTC AAG AAA
 GCA TTG CCA GCT CTT CCA ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTT GTT TTC TAC TTT
GCC ACA GAT TAT CTT GTA CAG CCT TTT ATG GAC CAA TTA GCA TTC CAT CAA
TTT TAT ATC TAG

Инвертированные концевые повторы (ITR) для одноцепочечного AAV2

SEQ ID NO: 16

nc_001401.2 нт 1-145 и 4535-4679

>левый ITR

ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg
 gctttgccg ggcggcctca gtgagcgagc gacgcgcgag agagggagtg gccactcca tctagggg ttct

SEQ ID NO: 17

>правый ITR

aggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgtcgc ctgctcact gaggccgggc gaccaaggt
 cggcgagc ccgggctttg cccgggcggc ctactgagc gacgcgagc gcagagaggg agtggccaa

Инвертированные концевые повторы для самокомплементарного AAV2

SEQ ID NO: 18

>левый ITR

ctgcgcgtcgtcgtcactgagccgcccgggcaaagccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagc
 gagcgagcgcagagagggagtg

SEQ ID NO: 19

>правый ITR

aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgcctactgaggccgggcgaccaaaaggctgcccga
cgcccgggctttgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag

Интроны

SEQ ID NO: 20

>MVM NC_001510.1, интрон мелкого вируса мышей, нт 2312-2403

aagaggtaa gggtttaagg gatggttggg tgggggggta ttaatgttta attacctgtt ttacaggcct gaaatcactt
ggttttaggt tgg

SEQ ID NO: 21

>гибридный аденовирус SD/IgG SA; ac_000008.1 аденовирус типа 5, тройная лидерная последовательность, нт 573-758 и nc_000078.6 mus musculus, штамм c57bl/6j, нт 115158736-115158695

tctgccac ggaggtgtta ttaccgaaga aatggccgcc agtcttttgg accagctgat cgaagaggta ctgctgata
atctccacc tctagccat tttgaaccac ctaccctca cgaactgta t gatftagacg tgacggcccc cgaagatccc
aacgaggagg cggtttcgca gatfttctc tgacatc cactttgect ttctctccac aggtgtccac tcccaaa

SEQ ID NO: 22

>интрон hBG, химерный промотор цмв 601-734, интрон 1 цмв 1263-1294, за которым следует интрон ii гена бета-глобина. 3'-конец интрона слит с первыми 20 нуклеотидами экзона 3 гена бета-глобина.

tcagatcgectggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcgattcgaatc
ccggccgggaacgggtgcatggaaacgcggattccccgtccaagagtacgtaagtaccgcctatagagtctatagccccacaaaaatg
ctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctttctttcaggccaataatgatacaatgatcatgctctttgccc
attctaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaataatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggt
ttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggtgggataaggctggattattctgagccaagctaggeccctttt
gctaatacatgttcatacctcttatcttctctccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgtctggccccatcactttggcaagaatt

Промоторы**SEQ ID NO: 23**

>CAG It727518.1, нт 3074-4750

gacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gccatataat ggagtccgc
gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgacce ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccccac ttggcagtac
atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggf aatggccccg cctggcatta tgcccagtac
atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgtattacc atggctgagg tgagccccac gttctgcttc
actctccca tctccccccc cteccacc ccaatttgt attatttat ttttaafta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg
ggggggcccc ccccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaaa ggtgcggcgg
cagccaatca gacggcgcg ctccgaaagt ttcttttat ggcgagggcg cggcgggcgg ggcctataa aaagcgaagc
gcgcgggcgg cgggagtcgt tgcgcgctgc ctcccccg tccccgctc cgcgcccgc tcgcggccc cggcccggct
ctgactgacc gcgttactcc cacagggtgag cggcggggac ggcctctc ctccgggctg taattagcgc ttggttaat
gacggcttgt ttctttctg tggctgctg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtcgggggg gacggcctc

gggggtgctg gctgtgtgt gtgctgggg agcgccgct gcgctccgc gctccccgc ggctgtgagc gctcggggcg
 cggcgcgggg ctttgtgctg tccgagtg ggcgagggg agcgcgccg gggcggtgc ccccggtgc ggggggggct
 gcgaggggaa caaaggctgc gtgcggggtg tgtgctggg ggggtgagca ggggtgtgg gcgctcgtt cgggctgca
 cccccctgc accccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg tgcggggctc cgtacggggc gtggcgggg
 gctcggctg cggggcgggg ggtggcgga ggtgggggtg ccggcgggg cggggccgc tcggcgggg gagggctcgg
 ggaaggggc gcggcgccc ccggagcgc ggcgctgc gaggcgggc gagccgagc cattgcctt tatgtaac
 gtgcgagagg gcgagggac ttccttgc ccaatctgt gcggagccga aatctgggag gcgccgcgc acccctca
 gcggcgcg ggcaagcgg tgcggcgcc gcaggaagga aatggcggg gagggcctc gtgctgccc gcgccgct
 cccctctcc ctctccagc tcgggctgt ccgcggggg acgctgctc tcgggggga cggggcagg cggggtcgg
 ctctgctg gtgaccggc gctctagag ctctgtaac catgtcatg cctctctt tttctacag

SEQ ID NO: 24

>CBA HT_006273.2, HT 175625-175294 и номер доступа GenBank № x00182.1, HT 280-540.

cgctgacattgattgactagttattaatagtaataaataacggggctcattgtcatagcccataatggagtccgcgttcat
 aacttacgtaaatgccccctggtgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacccaata
 gggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaactgccccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccct
 ttgacgtcaatgacgtaaatgccccctggcattatgccagtacatgaccttgggacttctacttggcagtacatctactgattagtc
 atcgtattaccatgctgagggcacgttctgcttactctccccctcccccccccccccccccaatttgtatttatttttttaattttt
 gcagcgatggggcgggggggggggggcgcgccagggcgggggcgggggcgagggcgggggcgggggcgagggcgagggcgagga
 ggtgcggcgagccaatcagagcgcgctccgaaagtcttcttattggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaa
 gcgcgcgggggg

SEQ ID NO: 25

>UBC d63791, HT 3553-4729

ggtgcagcggcctccgcggggtttggcgctcccggcgccccctcctcacggcgagcgtgccacgtcagacga
 agggcgaggagcgttctgacttccgcccggagcctcaggacagggccgctgctcataagactggccttagaacccagatca
 gcagaaggacatttaggacgggacttgggtgactctaggcactggtttcttccagagagcggaacagggcagggaaaagtagtccct
 ctggcgattctgaggaggatctccgtggggcggtgaacgccgatgattatataaggacgcggcggtgtggcacagctagtccgctg
 cagccgggatttgggtcgggtcttgttggatcgtgtgactggtgagttgcgggctgctgggctggccggggcttctggtg
 ccgggggctcgtggtgggacggaagcgtgtggagagaccgcaagggtgtagtctgggtccgcagcaaggttgcctgaactgg
 ggttgggggagcgcacaaaatggcggtgttcccagcttgaatggaagacgcttgaaggcggtgtgaggtcgttgaacaag
 gtgggggcatggtggcggaagaaccaaggcttgaggcctcgtaatcgggaaagcttattcgggtgagatgggctggggc
 accatctggggacctgacgtgaagttgctactgactggagaactcgggttctgctggttgcggggcggcagttatcggtgccgtt
 gggcagtgacccgtaccttgggagcgcgcctcgtcgtgacgtcaccgcttctgttggcttataatgcagggtggggccacctg
 ccggtaggtgtcggttagcttctccgctcagggacgcaggggtcgggctagggtaggtctcctgaatcagagggcgggacctct
 ggtgaggggagggataagtggcgtcagttcttggctggtttatgacctatctttaaagtagctgaagctccggttgaactatgcgct
 cggggtggcgagtgtttgtgaagtttttaggcacctttgaaatgtaacatttgggtcaatatgtaatttcagtgttagactagtaaa

SEQ ID NO: 26

>PGK nc_000086.7 106186725-106187235

ttctaccgggtaggggaggcgtttcccaaggcagctggagcatgcgctttagcagccccgctggcacttggcgctacaca
 agtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccgtaggcgccaaccggctccgttcttgggtggccccctcgcgccaccttactcct

ccctagtcaggaagttccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtgcag
atggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggctcagaggc
tgggaaggggtgggtccgggggctcagggcgggctcagggcggggcgccgaaggtcctccggaggcccgacatt
ctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgtgttctctctctcctcatctccgggctttcgacct

SEQ ID NO: 27

>Efla j04617.1, HT 379-1560

gctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatgccccacagtccccgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccg
gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtgactggctccgctttttcccagggtgggggagaaccgtatat
aagtgcagtagtcgccgtgaacgtttcttttcgcaacgggttggccccaacacaggtlaagtccgtgtgtgtttcccggggcctggcc
tctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattactccacgccctggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttcgggttgaagtgg
gtgggagagttcaggccttgcgttaaggagccccttcgctcgtgcttggattgaggcctggcctggggcgtggggccgcccgcgtgcg
aatctggtggcaccttcgcgctgtctcgtcttctgalaagtctctagccattaaaaattttgatgacctgctgcagcgtttttctggcaag
atagcttctglaaatgcgggccaagatctgcacactggattttcgggtttggggccgcccggcgacggggcccgtgctcccagcgcac
atgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgctggc
ctcgcgccgctgtatgccccgcccggggcaaggtggcccggcggcaccagtgcgtgagcggaaagatggccgcttcccg
gcctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgtcgggagagcggcggggtgagtcaccacacaaaggaaaaggcctttc
cgtctcagccgtcgttcatgtactccacggagtaccgggcgcccagggcacctcgattagttctcagcctttggagtacgtcgtcttt
agggtggggggaggggtttatgcgatggagttcccacactgagtggtgggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgaattctc
cttgaatttgcctttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaaagtttttcttccattcaggtgctgta

SEQ ID NO: 28

>ЦМВ

gtcgacattgattattgactagttattaatagtaatacaattacggggctattagttcatagcccatataggagttccgcgttacataac
ttacggtaaatggcccgctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacccaatagg
gactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtagccccctattg
acgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagatgacctatgggacttctacttggcagtagatctacgtattagtcac
gctattaccatggtgatgcggtttggcagtagatcaatggcgctggatagcgggttactcacggggatttccaagtctccacccttggc
tcaatgggagtttgggttggcaccatacaacgggactttccaaaatgctgtaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtg
tacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcgaatfaatacactactatagga
gacccaagctggctagcgtttaaactt

SEQ ID NO: 29

> NSE сходен с геном специфичной для нейронов энлазы *Rattus norvegicus*
ab038993.1, HT 1023-2715

agctctgagctctcctctgctcgcaccaatcctccaacccctatggtggatggctgacacagaaaatgtctgctcctgtatggg
acatttccccctcttccaataataagacaggatgaggcctagcttttctgctcctcaaaagttttaaagaacacattgacggcatttagggac
tctaaaggtggaggaggaatgagggaaatgcatcatgccaaggctggtctcatcatcactgctccaggggcccagagtggcttccagg
aagtattcttacaaggaagcccgatctgtagctaacactcagagcccatttctcgtgftaacccctcccagctcatatacaggagtaacat
gatcagtgacctgggggagctggccaaactcggggacctgcccagctgagggccttgggtgctgctggacaacccctgtccgatgaga
ctgactaccgccaggaggccctgggtgcagatggcacacctagagcgcctagacaaaagagtactatgaggacgaggaccgggcagaag
ctgaggagatccgacagaggctgaaggaggaacaggagcaagaactcagcccggaccaagacatggaaccgtacctcccgaactta
gtggctcctctagcctgcagggacagtaaggtgatggcaggaaggcagccccggagggtcaaaaggtgggcacgcgggaggagag

gccagagtcagaggctcgggtatctcagatatgaaggaaagatgagagaggctcaggaagaggtaaagaaagacacaagagaccag
 agaagggagaagaattagagagggaggcagaggaccgctgtctctacagacatagctggtagagactgggaggaaggatgaaccctg
 agcgcgatgaaggaaggaggtggctggtgatatggaggatgtagctgggccagggaagatctgcactaaaaatctgaagctaaa
 aataacaggacacggggtggagaggcgaaaggaggcgagagtgaggcagagagactgagaggcctggggatgtgggcattccggta
 gggcacacagttcactgtcttctttttccaggaggccaaagatgctgacgtcaagaactcataataccccagtggggaccaccgcattca
 tagccctgttacaagaagtgggagatgttctttttgtccagactggaaatccgttacctccccgaggctcaggttctgtggtggtcatctgt
 gtgcttgttctgtgggcctacctaaagtcctaagcacagctctcaagcagatccgaggcgactaagatgctagtaggggttctgtggagag
 aagagccgaggaggtgggctgtgatggatcagttcagcttcaataaaaaaggcgtttttatattctgtgtcagttcgtgaaccctgtggtg
 ggcttctccatctgtctgggttagtacctgccactatactggaataaggggacgcctgcttccctcaggttgctggacaaggttatgagcatc
 cgtgtactttatggggttccagcttggctcctggatcggccggcccttccccaccggttcggttccccaccaccaccgcgctcgtacgtg
 cgtctccgctgcagctcttgaactcatggggccccgggtcacatgcgctcgtcggctctataggcgccgccccctgccacccccg
 cccgcgctgggagccgcagccgcccactcctgctctctctgcgccc

SEQ ID NO: 30

>MeCP2 nc_000086.7, нт от -677 до +56, мышинный mescp2 метил-срп-связывающий белок 2

tgcccattataaacgtctgcaaagaccaaggttgatgttgatttactgtcagccttaagagtgcgacatctgctaatttagttaa
 taatacaatcagtagaccctttaaacaagtccttggcttgaacaacgccaggctcctcaacaggcaacttctacttctacagaaaatga
 taataaagaaatgctggtgaagtcaaatgcttatcacaatggtgaactactcagcaggaggctctaataggcgccaagagcctagactcc
 ttaagcggcagagtcacacaagggccccagttaatcctcaacattcaaatgctgccacaaaaccagccccctgtgcccctagccgecttctttt
 ccaagtgacagtagaactccaccaatccgcagctgaatggggctccgcttcttccctgcctaaacagacaggaactcctgccaattgagg
 gcgtcaccgctaaggctccgccccagcctgggctccacaaccaatgaagggtaatctcgacaaagagcaaggggtggggcgcgggcg
 cgcaggtgcagcagcacagggctggtcgggagggcgggcgcgacgtctgccgtcgggggtccccgcatcggttgcgcgcgctc
 cctcctctcgagagagggctgtggtaaaaccgtccgaaaatggccgcccgtgccc
 ccaccgcccggccgcccgcgcccagcggaggaggagg

SEQ ID NO: 31

>GFAP nc_000017.11, нт -1991-0, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) Homo sapiens

ggcaacatggcaagaccctatcttacaataaaagttaaaaaatcagccacgtgtggtgacacacacctgtagtcccagctattc
 aggaggtgaggtgaggggatcacttaaggtgggaggtgaggtgacgtgagctgtggtgcccactgcactccagcctgggcaac
 agtgagaccctgtctcaaaagacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaacatctctggtgtggagtggggacgctgctctgacagag
 gctcgggggctgagctggctctgtgagctggggaggaggcagacagccaggccttctctgcaagcagacctggcagcattgggctgg
 ccgccccagggcctcctcttcatgcccagtgaatgactcaccttggcacagacacaatgttcgggggtgggcacagtgcttctcccgc
 cgcacccccagccccctcaaatgcttccgagaagccattgagcagggggcttgcattgcacccccagcctgacagcctggcattctggg
 ataaaagcagcacagccccctaggggctgcccttctgtgtggccaccggcggtggagaacaaggtctattcagcctgtgcccagg
 aaaggggatcaggggatgccaggcatggacagtgggtggcagggggggagaggaggctgtctgcttcccagaagtccaaggacac
 aatgggtgaggggactgggcaggggttctgacctgtgggaccagagtggagggcgtagatggacctgaagtctccagggacaacagg
 gccaggtctcaggtcctagtgggcccagtggtccagcgttccaaccatccatccccaggggttctcccactctccaggctgatg
 tgtgggaactcagggaaataaatctccagtgggagacggaggggtggccagggaaacggggcgctgcaggaataaagacgagccagc
 acagccagctcatgtgtaacggcttctggagctgtcaaggcctggtctctgggagagagggcacagggaggccagacaaggaaggggtg
 acctggagggacagatccaggggctaaagtctgataaggcaagagagtgcggcccccttgcctatcaggacctccactgccacat

agaggccatgattgacccttagacaaagggctggtgtccaatcccagccccagccccagaactccagggaatgaatgggcagagagca
 ggaatgtgggacatctgtgtcaaggaaggactccaggagtctgctgggaatgaggcctagtaggaaatgaggtggccttgagggtac
 agaacaggttcattcttcgcaaattcccagcacctgcaggcacttacagctgagttagataatgctgggtatgaaatcaaaaagtggga
 aagcaggtcagaggatctggtacagcccttctccctttttttttttttttgtgagacaaggctctctctgttggccaggctggagtggcg
 caaacacagctcactgcagcctcaacctactgggctcaagcaatcctccagcctcagcctcccaaagtctgggattacaagcatgagcca
 cccactcagcccttctctcttttaattgatgcataataattgtaagtattcatcatggtccaaccaaccttcttgaccaccttcttagaga
 gagggtcctctgttgcagcggtcaggccccagaccatggtctggtccaggtaccacctgctcatgcaggagtggcgtgccagg
 aagctctgctctgggcacagtgacctagtggggtgaggggagctctccccatagctgggctcggcccaacccccccccctcaggcta
 tgcaggggggtgtgccagggggcaccgggcatgccagcttagcccactctcataaagcctcgcacccaggagcga
 gcagagccagagcagg

SEQ ID NO: 32**Tag**

>HA

taccctatgacgtgacctgactatgcc

Сигналы полиаденилирования**SEQ ID NO: 33**

>hGH ng_011676.1, нт 6537-7013

gggtggcatccctgtgaccctcccagtcctctctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgcctaataa
 aattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtcctctataatattgggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagac
 aacctgtaggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggtcactgcaatctccgctcctgggttcaag
 cgattctctgctcagcctcccagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttggtagagacggggttca
 ccatattggccaggctggtctccaactcctaactcaggtgatctaccacctggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactg
 ctcccttccctgtcctt

SEQ ID NO: 34

>rBG ah001222.2, нт 1623-1749

gatcttttccctctgccccaaattatggggacatcatgaagccccctgagcatctgactctggctaataaaggaaattattttcatt
 gcaatagtgtttggaattttttgtctctcactcg

SEQ ID NO: 35

>rBG ah001222.2, нт 1690-1745

aataaaggaaattattttcattgcaatagtgtgtggaattttttgtctctca

SEQ ID NO: 36

СИНТЕТИЧЕСКАЯ КДНК PSEN1 с удалением максимального количества динуклеотидов CpG путем изменения только толерантных кодонов. Измененные кодоны указаны строчными буквами.

ATGACAGAGTTACCTGCACcaTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAG
 GACAACCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAAagaCAGGAG
 CACaatGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTATCTAATGGAagaCCCCAGGG
 TAACTCCagaCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGA
 AATATggtGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTG
 gttGTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCT

ATACCCCATTCACAGAAGATAACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATT
 CTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTC
 TGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATT
 GTTGCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTTTAAAACCTATAatGTTGC
 TGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGAT
 TTCCATTCACTGGAAAGGTCCACTtagaCTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGT
 GCCCTCATGGCCCTGGTGTTTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTgccTGGCTCATCTT
 GGCTGTGATTTCAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTcccAAAGGTCCACTTCGTA
 TGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAaccTTTTTCCAGCTCTCATTTACTC
 CTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAAGGAGACccaGAAGCTCAAAGGAG
 AGTATCCAAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAAGAC
 ACTGTTGCAGAGAATGATGATggtGGGTTCAAGTGAAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGAC
 AGTCATCTAGGGCCTCATaggTCTACACCTGAGTCAagaGCTGCTGTCCAGGAACTTTC
 CAGCAGTATCctgGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAACCTGGATTGGG
 AGATTTCAATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGA
 CTGGAACACAACCATAGCCTGtttGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTAT
 TACTCCTTGCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGG
 GCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCA
 TTCCATCAATTTTATATCTAG

SEQ ID NO:37

hPSEN1v1.5. PSEN1 с некоторыми толерантными кодонами, замененными на наиболее предпочтительные синонимичные кодоны. Измененные кодоны указаны строчными буквами.

ATGACAgaatTACCTgccccTTGagcTACTTCCAGAATGCACAGATGagcGAGGAC
 AAC
 CACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACaacAGAGAACGGCAGgaaCACAACG
 AC aggCGGAGCctgGGCCACCCTGAGcccctgTCTAATGGAagaCCCCAGGGTAAACagcaga
 CAGGTGGTGgaaCAAGATGAGGAAgaggacGAGGAGCTGaccctgaagtacGGCGCCAAG
 cacGTGATCATGCTCtctggtgcccGTGACTCTCTGCATGGTGGTGTgtgGTGGCTacaatc
 AAGagcGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATAACCCATTCACAG
 AA
 gacACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAatcCTGAATgccGCCATCATGATC
 agcGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAA
 G GTCATCCATGCCTGGctgatcATATCATCTctgTTGctgCTGTTCTTTTTTtagcTTCATT
 TACctgggcGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTgccGTGGACTACATTACTGTTgccCTC
 CTGATCTGGaactcggcGTGGTGggcATGATTTCCATTCACTGGAAAggccccctgaga
 ctgCAGCAGGCAtacCTCATTATGatctccGCCCTCATGGCCCTGGTgtcATCAAGTAC
 ctgccccgagTGGACTgctTGGCTCATCTTGGCTGTGatctccgtgTATGATTTAGTGGCT
 GTTctgTGTcctAAAGGTCCActgCGTATGCTGgtgGAAACAGCTCAGgaaAGAAATGAA
 aactgTTTcctGCTctgATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGctcGTGAATATGgccGAA

GGAGACcctGAAgccCAAacggAGAggtTCCAAAaacTCCAAGTATAacgccgagAGCACA
 GAAAGGGAGagccaggatacaGTTgccGAGAATgacGATGGCggcTTCAGTGAGGAATGG
 GAAGCCCAGAGGGGACagccacctgGGGCCTcacagaagcaccCCTGAGtctagagccGCT
 GTCCAGGAActgTCCAGCtccATCctggccggcGAAGACcccgaagAAAGGGGAGTAAAA
 CTTGGActgGGAGATTTcAtcTTCTACAGTGTTtctGTTggcAAAGCCcagcGCAACAgct
 agcGGAGACTGGAACACAacaATAGCCTGTTTCGTAGCCcAtcTTAATTggcctgTGCCTT
 ACActtctgCTCctgGCCAtcTTCAAGaagccctgCCAgccctgcctATCagcATCACC
 ttcGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCaccGATTATctggtgCAGcccttcATGGACcagctg
 gccTTCcaccagTTTtacATCTAG

SEQ ID NO: 38

hPSEN1v2.0. PSEN1 с некоторыми толерантными кодонами, замененными на наиболее предпочтительные синонимичные кодоны. Измененные кодоны указаны строчными буквами.

ATGACAGAGTTACCTGCAcccTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAG
 GACAAC
 CACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAA
 CGAC
 AGACGGAGCctcGGCCACCCTGAGCCAttgTCTAATGGAcggCCCCAGGGTAACTCCCGG
 CAGGTGGTGGAGcagGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGAAATATGGCGC
 CAAG
 CATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTTCGTGGCTACCA
 TT
 AAGTCAGTCAGCTTTTATAACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATAACCCCATTCACA
 GAA
 GATACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATG
 ATC
 GTCATCCATGCCTGGctcATTATATCATCTctgTTGTTGCTGTTCTTTTTTTTCATTCATT
 TACTTGGGGGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCA
 CTC
 CTGATCTGGAATTTTggcGTGGTGgggATGATTTCCATTCAGTGGAAAggcCCAactccgg
 CTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGT
 AC
 CTCCCTGAATGGACTgccTGGCTCATCTTGGCTGTGATTTCAgtgTATGATTTAGTGGCT
 GTTTTGTGTcccAAAGGTCCActcCGTATGCTGgtcGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAA
 accctcTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAA
 GGAGACcccGAAGCTCAAAGGAGAggtTCCAAAATTCGAAGTATAATGCAGAAAGCA
 CA
 GAAAGGGAGTCAcagGACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAA
 TGG
 GAAGCCCAGAGGGACAGTCATctgGGGCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCAcggGCTG

CT

GTCCAGGAActcTCCAGCAGTATCCTCGCTggcGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAA
AA

CTTGGATTGGGAGATTTTCAATTTTCTACAGTGTCTGGTTggcAAAGCCTCAGCAACAG
CC

AGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCatcTTAATTggcTTGTGCCT
T ACAttgtgCTCctcGCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTctcCCAATCTCCATCACC
TTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATctcgtgCAGCCTTTTATGGACcagttg
GCATTCCATCAATTTTATATCTAG

SEQ ID NO:39

hPSEN1 v3.0 PSEN1 с толерантными кодонами, замененными на наиболее предпочтительные синонимичные кодоны. Измененные кодоны указаны строчными буквами.

ATGACAGAGTTACCTgccccTTGagcTACTTCCAGAATGCACAGATGagcGAGGA
CAACCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACaacAGAGAACGGCAGGAGCA
CAACGACAGACGGAGCctgGGCCACCCTGAGcccctgagcAATGGAagaCCCCAGGGTAAC
agcCGGCAGGTGGTGGAGcagGATGAGGAAgaggacGAGGAGCTGaccctgaagtacGGCGCCA
AGcacGTGATCATGCTCttcgtgcccGTGACTCTCTGCATGGTGGTggtgGTGGCTACCatcAA
GagcGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTACAGAA
gacACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAatcCTGAATgccGCCATCATGATC
agcGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAA
GGTCATCCATGCCTGGctgatcATATCATCTctgTTGctgCTGTTCTTTTTTtagcTTCATTTACc
tgggcGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTgccGTGGACTACATTACTGTTgccCTCCTGAT
CTGGaactcggcGTGGTGggcATGATTtagcATTCAGTGGAAAaggccccctgagactgCAGCAGGCat
acCTCacATGatcagcGCCCTCATGGCCCT
GGTGttcATCAAGTACctgcccagTGGACTgccTGGCTCATCTTGGCTGTGatcagcgtgTATGA
TTTAGTGGCTGTTctgTGTcccAAAGGTCCAActgCGTATGCTGgtggagACAGCTCAGGAGA
GAAATGAAaccctgTTTcccGCTctgATTTACTCCTCAaccATGGTGTGGctgGTGAATATGgcc
GAAGGAGACcccGAagccCAAcggAGAgtagcAAAaacagcAAGTATAacgccgagAGCACAGA
AAGGGAGagccagGACaccGTTgccGAGAATgacGATGGCggcTTCAGTGAGgagTGGGAAG
CCCAGAGGGACagccacctgGGGccccacagaagccccGAGagcagagccGCTGTCCAGGAAActgT
CCAGCagcATCctgcccggcGAAGACcccGAGGAAAGGGGAGTAaagCTTGGActgGGAGATT
TCatcTTCTACAGTGTCTGGTTggcAAAGCCagcGCAACAGCCagcGGAGACTGGAACAC
AACCATAGCCTGTTTCGTAGCCatcTTAATTggcctgTGCCTTaccctgctgCTCctgGCCatcTTC
AAGaaggccctgCCAgccctgcccATCagcATCACctcGGGCTTGTTTTTCTACTTTGCCaccGATT
ATctggtgCAGcccttcATGGACcagctggccTTCcaccagTTTtacATCTGA

SEQ ID NO:40

ПРОМОТОР CAG, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ПАТ029, ПАТ024 И ПАТ022

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC

TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCC
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
 TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCCA
 GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCG
 GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG
 GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
 CGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
 CGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
 GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
 CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
 TCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
 CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGC
 GGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
 GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCC
 CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG
 TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG
 CGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTT
 ATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCC
 GAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGG
 CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCCGCCGT
 CCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG
 ACGGGGACGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG
 СТААССАТГТТСАТГССТТСТТТТТСТТАСАГ

SEQ ID NO: 41

Кассета экспрессии для продукции AAV, содержащая ITR AAV2 (1-141, 4553-4693), промотор пресенилина-1 (подчеркнутые 237-1200), синтетический интрон бета-глобина человека (1221-1786), HA-метку (1866-1898), кодон-оптимизированный человеческий пресенилин-1v1.5 (SEQ ID NO: 37, 1899-3299 верхним регистром), последовательность полиаденилирования человеческого гормона роста (3330-3806) и геномную последовательность альбумина (3810-4522).

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggacaccttggtcggccg
 cctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctgcggccaattcagtcgataactatacgg
 cctaaggtagcgatttaatacgcgctctcttaaggtagccccgggacgcgtcaattgagatctcgggggtggattttaaagaacttagaa
gaatgtaactgccagataccatgtaccgttaatttcatttcggtttttgaataccatgtttgacatttctccgttcaccttgattaaataagga
gtattcatttttagtttagcttttgatataatgttaagtggtatgctgtcctaatgaattagacattggtactgtctttacaaaactggacaaag

agcaggcagatgcaaaaatcaagtgacccagcaaacagacacatttctgctctcagctagcttgccacctagaaagactggtgtcaaaag
ggggagtgccaagaatcgcgaggatgttfaaaatgcagtttctcaggttctgccaccaccagaagttttgattcattgagtggtggagag
ggcagagatattgcgatttaacagcattctcttgattgtgatgcagctggttcgcaaataggtaccctaaagaaatgacaggtgttaatttag
gatggccatcgcttgtatgccgggagaagcacacgctgggcccatttatataggggctttcgtcctcagctcgagcagcctcagaacccc
gacaaccacgcccagcgtctggcggttccgtcaggtggggaaggccaggtggagctctgggttctccccgcaatcgtttctccaggc
cggagggccccgcccccttctctggtcctccccctcctcctggggccggcccaacgacgccagagccggaatgacgacaacggt
gagggttctcggcgggggcctgggacagcagctccgggtcccggtttcacatcgaaacaaaacagcggtggtctggaaggaac
ctgagctacgagcccgcgccagcggggcgccggggaagcgtatgtcgtgatggggagtcgggcaagccaggaagggcaccgc
ggacatggcggaagcttctgttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctcatagaagacaccgggacc
gatccagcctcccggttcaatcccggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtacgtaagtaccgctat
agagtctatagggccacaaaaatgctttcttcttaataatactttttgttatcttatttctaatactttccctaactcttttttcagggaataatg
atacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctcatataaatatttctgc
atataaattgtaactgatglaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttattttgtggttgggataaggctgga
ttattctgagccaagctaggcccttttctaategtgttcatacctcttatcttctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgtctggc
ccatcactttggcaagaattaccggtctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcactttttggcaagaattcacccccagagcc
gccaccATGgctaccatacagatgttccagattacgtACAGAATTACCTGCCCCCTTGAGCTACTTCCA
GAATGCACAGATGAGCGAGGACAACCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATG
ACAACAGAGAACGGCAGGAACACAACGACAGGCGGAGCCTGGGCCACCCTGAGCC
CCTGTCTAATGGAAGACCCAGGGTAACAGCAGACAGGTGGTGGAAACAAGATGAGG
AAGAGGACGAGGAGCTGACCCTGAAGTACGGCGCCAAGCACGTGATCATGCTCTTC
GTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTGGTGGCTACAATCAAGAGCGTCAGCTTT
TATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTACAGAAGACACCGAGAC
TGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATCCTGAATGCCGCCATCATGATCAGCGTCAT
TGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATC
CATGCCTGGCTGATCATATCATCTCTGTTGCTGCTGTTCTTTTTTAGCTTCATTTACCT
GGGCGAAGTGTTTAAACCTATAACGTTGCCGTGGACTACATTACTGTTGCCCTCCT
GATCTGGAACTTCGGCGTGGTGGGCATGATTTCCATTCACTGGAAAGGCCCCCTGAG
ACTGCAGCAGGCATACTCATTATGATCTCCGCCCTCATGGCCCTGGTGTTCATCAA
GTACCTGCCCGAGTGGACTGCTTGGCTCATCTTGGCTGTGATCTCCGTGTATGATTTA
GTGGCTGTTCTGTGTCTAAAGGTCCACTGCGTATGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAA
AGAAATGAAACACTGTTTCCTGCTCTGATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGCTCGTG
AATATGGCCGAAGGAGACCCTGAAGCCCAACGGAGAGTGTCCAAAACTCCAAGTA
TAACGCCGAGAGCACAGAAAGGGAGAGCCAGGATACAGTTGCCGAGAATGACGAT
GGCGGCTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGCCACCTGGGGCCTCACAG
AAGCACCCTGAGTCTAGAGCCGCTGTCCAGGAAGTGTCCAGCTCCATCCTGGCCGG
CGAAGACCCCGAAGAAAGGGGAGTAAACTTGGACTGGGAGATTTTCATCTTCTACA
GTGTTCTCGTTGGCAAAGCCAGCGCAACAGCTAGCGGAGACTGGAACACAACAATA
GCCTGTTTCGTAGCCATCTTAATTGGCCTGTGCCTTACACTTCTGCTCCTGGCCATCT
TCAAGAAGGCCCTGCCAGCCCTGCCTATCAGCATCACCTTCGGGCTTGTTTTCTACTT
TGCCACCGATTATCTGGTGCAGCCCTTCATGGACCAGCTGGCCTTCCACCAGTTTTA

gataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcag
ctacaatccagctaccattctgcttttatttgggtgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttctaatcgtgtcatacct
cttatcttctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggcccatcactttggcaagaattaccgggtggcaacgtgctggttatt
gtgctgtctcatcattttggcaagaattcacgccccagagccgccaccATGgcctaccatacagatgttccagattacgctACAGA
ATTACCTGCCCCCTTGAGCTACTTCCAGAATGCACAGATGAGCGAGGACAACCACCT
GAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAACAGAGAACGGCAGGAACACAACGAC
AGGCGGAGCCTGGGCCACCCTGAGCCCCTGTCTAATGGAAGACCCCAGGGTAACAG
CAGACAGGTGGTGGAAACAAGATGAGGAAGAGGACGAGGAGCTGACCCTGAAGTAC
GGCGCCAAGCACGTGATCATGCTCTTCGTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTG
GTGGCTACAATCAAGAGCGTCAGCTTTTATAACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTAT
ACCCCATTCACAGAAGACACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATCCT
GAATGCCGCCATCATGATCAGCGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTG
TATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTGATCATATCATCTCTGTTG
CTGCTGTTCTTTTTTAGCTTCATTTACCTGGGCGAAGTGTTTAAACCTATAACGTTG
CCGTGGACTACATTACTGTTGCCCTCCTGATCTGGAACCTTCGGCGTGGTGGGCATGA
TTTCCATTCACTGGAAAGGCCCTGAGACTGCAGCAGGCATACCTCATTATGATCT
CCGCCCTCATGGCCCTGGTGTTCATCAAGTACCTGCCCGAGTGGACTGCTTGGCTCA
TCTTGGCTGTGATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCCTAAAGGTCCACT
GCGTATGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTCTGCTCTGA
TTTACTCCTCAACAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACCCTGAAGCCC
AACGGAGAGTGTCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAAAGGGAGAG
CCAGGATACAGTTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCC
AGAGGGACAGCCACCTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAGCCGCTGTC
CAGGAACTGTCCAGCTCCATCCTGGCCGGCGAAGACCCCGAAGAAAGGGGAGTAAA
ACTTGGACTGGGAGATTTTCATCTTCTACAGTGTCTCTCGTTGGCAAAGCCAGCGCAAC
AGCTAGCGGAGACTGGAACACAACAATAGCCTGTTTCGTAGCCATCTTAATTGGCCT
GTGCCTTACACTTCTGCTCCTGGCCATCTTCAAGAAGGCCCTGCCAGCCCTGCCTATC
AGCATCACCTTCGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACCGATTATCTGGTGCAGCCCTTCA
TGGACCAGCTGGCCTTCCACCAGTTTTTACATCTAGtaagcggccgcccctaggagctcctcgaggggggt
ggcaccctgtgaccctccccagtgccctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgccttaataaaattaagttgcat
cattttgtctgactaggtgtcctctataatattatgggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaaggggggaagacaacctgtagg
gcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatctggctcactgcaatctccgctcctgggttcaagcgattctctg
cctcagcctcccagttgtgggattccagggcatgcatgaccaggctcagctaattttgttttttggtagagacggggttccacatattggcc
aggetggtctccccctcctaattcaggtgatctaccaccttggcctccaaattgctgggattacagggctgaaccactgctccctccctg
tcctctgattttaaataactataaccagcaggaggacgtccagacacagecataggetacctggccatgcccaccgggtgggacatttgatt
gcttgcctggcactgtcctctcatgcttgggtccactcagtagatgctgtgtaattcctgggctagggtgtgccagctgctcgtccctg
caccttctggcttctctcctccatatttagctgtttctctatgagaatgttccaaattcgaaatttctatttaaccattatataatttactgtttgc
tattatctctgccccagtagattgttagctccagaagagaaggatcatgtcttttctttagatagatgcccactgctgtgtaacaatctctgg
cacatgttacaggcaacaactactgtggaattggtgaatgcatgaatagaagaatgagtgaatgaatgaatagacaataggcagaaatcca
gcctcaaagagcttacagtctgtaagaggaataaaatgtctgcaaatagccacaggacaggtcaaaggaaggaggggctatttccagct

gagggcaccatcaggaagcaccagacttccttagggataacagggtaatggcgccggccgaggaaccctagtgatggagttg
 gccactccctctctgcgctcgcctcactgagggccggcgaccgaaaggctgccccgacgcccgggctttgcccggcgccctcagt
 gagcgagcgagcgcgagctgcctgcagg

SEQ ID NO: 43

Кассета экспрессии для продукции AAV, содержащая ITR AAV2 (1-141, 4554-4694), промотор СВА (подчеркнутые 237-890), синтетический интрон бета-глобина человека (911-1476), HA-метку (1556-1582), кодон-оптимизированный человеческий пресенилин-1v1.5 (SEQ ID NO: 37, 1550-2983 верхним регистром), последовательность полиаденилирования человеческого гормона роста (3014-3490) и геномную последовательность гормона роста человека (3014-3491).

cctgcaggcagctgcgctcgcctcactgagggcccccgggcaagccccggcgctggggcgacctttggcgccccgg
 cctcagtgagcgagcgagcgagagggagtgcccaactccatcactaggggttctgcggccaattcagtcgataactatacggg
 cctaaggtagcgatttaatacgcgctctcttaaggtagccccgggacgctcaattgagatctcgacattgattttagctagttataatag
aatcaattacggggtcatttagttcatagcccatataggagttccgcgttacataacttacggtaaatggccccgctggctgaccgccaacg
acccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccccatgtaacgccaatagggaacttccattgacgtcaatgggtggagtatttacgta
aactgccccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtagccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccccgctggcattatgc
ccagtacatgacctatgggacttctacttggcagtacatctactgatttagctatgctattaccatgctgagggccacgttctgcttactctcc
ccatctcccccccccccccccccaattttgtatttttttttttaattttttgtgcagcgatggggggcgggggggggggggcgcgccag
gcgggggcgggggcgggggcgagggcgggggcgagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcgggcgctccgaaa
gtttcttttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaaagcgaagcgcgcggggggggagcaagcttcgtttagtgaaccg
 tcagatcgctggagacgcatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggttcgaatccccggc
 gggaacggtgcattggaacgcggttccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgctatagagctatagggccacaaaaatgctttctc
 ttttaataactttttgtttatcttatttctaactttccctaactctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcactctttgcaccattctaaa
 gaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattglaactgatgtaagaggttcatattg
 ctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttatttgtggttgggataaggctggattattctgagccaagctaggcccttttctaatc
 gtgttcatactcttattctctcccacagctctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggccatcactttggcaagaattaccggtggcaac
 gtgctggttattgtgctgctcatcattttgcaagaattcacgccccagagccgcccaccATGgctaccatacagatgttccagattacg
 ctACAGAATTACCTGCCCCCTTGAGCTACTTCCAGAATGCACAGATGAGCGAGGACA
 ACCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAACAGAGAACGGCAGGAACAC
 AACGACAGGCGGAGCCTGGGCCACCCTGAGCCCCTGTCTAATGGAAGACCCCAGGG
 TAACAGCAGACAGGTGGTGGACAAAGATGAGGAAGAGGACGAGGAGCTGACCCTG
 AAGTACGGCGCCAAGCACGTGATCATGCTCTTCGTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTG
 GTGGTGGTGGCTACAATCAAGAGCGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCT
 AATCTATACCCCATTACAGAAAGACACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACT
 CAATCCTGAATGCCGCCATCATGATCAGCGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGT
 GGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAAGGTCATCCATGCCTGGCTGATCATATCATC
 TCTGTTGCTGCTGTTCTTTTTTAGCTTCATTTACCTGGGCGAAGTGTTTAAAACCTAT
 AACGTTGCCGTGGACTACATTACTGTTGCCCTCCTGATCTGGAACCTTCGGCGTGGTG
 GGCATGATTTCCATTCAGTGGAAAGGCCCCCTGAGACTGCAGCAGGCATACCTCATT
 ATGATCTCCGCCCTCATGGCCCTGGTGTTCATCAAGTACCTGCCCGAGTGGACTGCT

TGGCTCATCTTGGCTGTGATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCCTAAAG
 GTCCACTGCGTATGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTCCT
 GCTCTGATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACCTT
 GAAGCCCAACGGAGAGTGTCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAAA
 GGGAGAGCCAGGATACAGTTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATGG
 GAAGCCCAGAGGGACAGCCACCTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAGC
 CGCTGTCCAGGAACTGTCCAGCTCCATCCTGGCCGCGAAGACCCCGAAGAAAGGG
 GAGTAAAACCTTGGACTGGGAGATTTTCATCTTCTACAGTGTTCCTCGTTGGCAAAGCCA
 GCGCAACAGCTAGCGGAGACTGGAACACAACAATAGCCTGTTTCGTAGCCATCTTA
 ATTGGCCTGTGCCTTACACTTCTGCTCCTGGCCATCTTCAAGAAGGCCCTGCCAGCC
 CTGCCTATCAGCATCACCTTCGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACCGATTATCTGGTGC
 AGCCCTTCATGGACCAGCTGGCCTTCCACCAGTTTTACATCTAGTaaagcggccgcctaggag
 ctctcaggggggtggcatccctgtgacccctccccagtgccctcctggccctggaagtggccactccagtgcccaccagcctgtcctaa
 taaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagggggga
 agacaacctgtagggcctgcgggtctattgggaaccaagctggagtgagtgccacaatctggctcactgcaatctccgctcctgggtt
 caagcattctcctgctcagcctcccagttgtgggattccagggcatgcatgaccaggtcagctaattttgtttttgtagagacgggg
 ttccaccatattggccaggtggtctccccctctaactcaggtgatctaccacctggcctcccaattgctgggattacagggctgaacc
 actgctccctccctgtcctctgattttaaataactataaccagcaggaggacgtccagacacagcataggctacctggccatgcccaccg
 gtgggacattgagttgctgctggcactgtcctctcatgctgtgggtccactcagtagatgctgtgtaattcctgggctagggctgtgcca
 gctgctcgtcccgtcactctggttctctcctccatacttagctgtttctcatgagaatgttccaaatcgaaattctatftaaccatt
 atatafttactgtttgctattatctctgccccagtagattgttagctccagaagagaaggatcatgtctttgcttactagatatgccatctgc
 ctggtacaatctctggcacatgttacaggcaacaactactgtggaattggtgaatgcatgaatagaagaatgagtgaatgaatgaatagaca
 ataggcagaaatccagcctcaagagcttacagtctgtaagaggaataaaatgctgcaaatagccacaggacaggtcaaaggaaggag
 gggctattccagctgagggcaccccatcaggaaagcaccacagacttctacaactactagacacatctcgatgctttcacttctctatcaa
 tggatcgtctccctggagaataatccccaaagtgaatfacttagcacgtccaggttaggtatcctgtgtacttctgtgttgcagagatcat
 caaccagtgcaaacatcccccatcaatacacagcagtgctgcccctctcccccgaggtctccgagggccttctccgtgctgaac
 ccctggacatatcatatggcaactgaagtgtccaacgagatataggaagtgaacacgatgtactgaaactgcaatacaaatatgca
 gcatgaagtgctcggttactaaccgagctacgctgggtgcttctttctaccactttcctaatgcctatggacacctcattctgtggtgaa
 gttcctgtgtcaatagggataacagggtaatggcgcgggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgctgctcgc
 tcgctcactgagggccggcgaccaaaggtgcccgcagcccgggtttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgc
 ctgcagg

SEQ ID NO: 44

Кассета экспрессии для продукции AAV, содержащая ITR AAV2 (1-141, 4500-4640), промотор EF-1альфа (подчеркнутые 237-1415), синтетический интрон бета-глобина человека (1436-2001), HA-метку (2081-2107), кодон-оптимизированный человеческий пресенилин-1v1.5 (SEQ ID NO: 37, 2075-3508 верхним регистром), последовательность полиаденилирования человеческого гормона роста (3539-4015) и геномную последовательность гормона роста человека (4016-4469).

cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgagccgcccgggcaagcccgggctcgggacctttggtcggccgg
 cctcagtgagcgagcgagcgagcagagagggtggccaactccatcactaggggttctcggccaattcagtcgataactataacggt

cctaaggtagcgatttaatacgcgctctcttaaggtagccccgggacgcgtcaattgagatctcggctccgggtcccgtcagtgggcaga
gcgcacatcgeccacagtccccgagaagggggggggaggggtcggcaaltgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaact
gggaaagtgatgtcgtgactggtccgctttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtcagtagtcgccgtgaacgttttttc
gcaacgggtttgccgccagaacacaggtaaagtgccgtgtgtggttccccggggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttga
attactccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttcgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaagagacc
cttcgcctcgtgcttgaattgaggcctggcctggggcgtggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgcttt
cgataagtctctagccattfaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctgcaagatagcttctaagtgcgggccaagatctgcacact
ggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccgctgcgtcccagcgacatgttcggcgagggcgggcctgcgagcgccgc
caccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgctgctcgcgccgccgtgtatgcccccgcctggggcg
gcaaggctggccccgtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggcctgctcgagggagctcaaaatggaggacgc
ggcgctcgggagagcggggcggtgagtcaccacacaaaggaaaaggcccttccgctcagccgtcgttcatgtgactccacggag
taccggcgccgctccaggcacctcgattagttctcagacttttgagtagctcgtcttttaggttgggggaggggtttatcgatggagtttc
cccacactgagtggggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatglaattctccttggaaatttgcctttttgagttggactttggttcat
tctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttctccattcagggtgctgtaagcttctgttagtgaaccgtcagatcgctggagaccca
tccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggattcgaatcccggccgggaacgggtgattggaacgc
ggattccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgctatagagctatagcccacaaaaatgctttcttcttaataactttttgttatcttat
ttctaactttccctaactctttctttcagggaataatgataaatgtatcatgctctttgaccattctaaagaataacagtataatcttggg
ttaaggcaatagcaatatttctgcatataaattttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagc
taccattctgctttttttgtggttgggataaggtggattattctgagccaagctaggcccttttctaategtttcatacctcttatcttctcc
cacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgctgcccacactttggcaaagaattaccgggtggcaacgtgctggttattgtctgtctcat
cattttggcaaagaattcacgccccagagccgccaccATGgcctaccatacagatgtccagattacgtACAGAATTACCT
GCCCCCTTGAGCTACTTCCAGAATGCACAGATGAGCGAGGACAACCACCTGAGCAA
TACTGTACGTAGCCAGAATGACAACAGAGAACGGCAGGAACACAACGACAGGCGG
AGCCTGGGCCACCCTGAGCCCCTGTCTAATGGAAGACCCCAGGGTAACAGCAGACA
GGTGGTGGAAACAAGATGAGGAAGAGGACGAGGAGCTGACCCTGAAGTACGGCGCC
AAGCACGTGATCATGCTCTTCGTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTGGTGGCT
ACAATCAAGAGCGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCC
ATTCACAGAAGACACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATCCTGAATG
CCGCCATCATGATCAGCGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTGTATAA
ATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTGATCATATCATCTCTGTTGCTGCT
GTTCTTTTTTAGCTTCATTTACCTGGGCGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGCCGTG
GACTACATTACTGTTGCCCTCCTGATCTGGAACCTTCGGCGTGGTGGGCATGATTTCC
ATTCACTGGAAAGGCCCCCTGAGACTGCAGCAGGCATACCTCATTATGATCTCCGCC
CTCATGGCCCTGGTGTTCATCAAGTACCTGCCCGAGTGGACTGCTTGGCTCATCTTG
GCTGTGATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCCTAAAGGTCCACTGCGTA
TGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTCCTGCTCTGATTTACT
CCTCAACAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACCCTGAAGCCCAACGG
AGAGTGTCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAAAGGGAGAGCCAGG
ATACAGTTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGG
GACAGCCACCTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAGCCGCTGTCCAGGA

CCCTTGAGCTACTTCCAGAATGCACAGATGAGCGAGGACAACCACCTGAGCAATAC
 TGTACGTAGCCAGAATGACAACAGAGAACGGCAGGAACACAACGACAGGCGGAGC
 CTGGGCCACCCTGAGCCCCTGTCTAATGGAAGACCCCAGGGTAACAGCAGACAGGT
 GGTGGAACAAGATGAGGAAGAGGACGAGGAGCTGACCCTGAAGTACGGCGCCAAG
 CACGTGATCATGCTCTTCGTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTGGTGGCTACA
 ATCAAGAGCGTCAGCTTTTATAACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATAACCCATTC
 ACAGAAGACACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATCCTGAATGCCGC
 CATCATGATCAGCGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTTCTGTATAAATAC
 AGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTGATCATATCATCTCTGTTGCTGCTGTTCT
 TTTTAGCTTCATTTACCTGGGCGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGCCGTGGACTA
 CATTACTGTTGCCCTCCTGATCTGGAACCTTCGGCGTGGTGGGCATGATTTCCATTAC
 TGGAAGGCCCCCTGAGACTGCAGCAGGCATACCTCATTATGATCTCCGCCCTCATG
 GCCCTGGTGTTCATCAAGTACCTGCCCGAGTGGACTGCTTGGCTCATCTTGGCTGTG
 ATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCTAAAGGTCCACTGCGTATGCTGG
 TGGAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTCCTGCTCTGATTTACTCCTCAA
 CAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACCCTGAAGCCCAACGGAGAGTG
 TCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAAAGGGAGAGCCAGGATACAG
 TTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGC
 CACTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAGCCGCTGTCCAGGAACTGTC
 CAGCTCCATCCTGGCCGGCGAAGACCCCGAAGAAAGGGGAGTAAACTTGGACTGG
 GAGATTTTCATCTTCTACAGTGTTCGTTGGCAAAGCCAGCGCAACAGCTAGCGGAG
 ACTGGAACACAACAATAGCCTGTTTCGTAGCCATCTTAATTGGCCTGTGCCTTACAC
 TTCTGCTCCTGGCCATCTTCAAGAAGGCCCTGCCAGCCCTGCCTATCAGCATCACCTT
 CGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACCGATTATCTGGTGCAGCCCTTCATGGACCAGCTG
 GCCTTCCACCAGTTTTACATCTAGtaagcggccgcccctaggagctcctcgagggggtggcatccctgtaccct
 cccagtgccctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagcctgtcctaataaataagttgcatcattttgtctgactaggtg
 tcctctataatattatgggggtggaggggggtggatggagcaaggggcaaggggggaagacaacctgtagggcctgccccgtctattgg
 gaaccaagctggagtgcaatggtgcaatcttggctcactgcaatctccgctcctgggttcaagcgattctcctgctcagcctcccagttg
 ttgggattccaggtcatgaccaggtcagctaatTTTTTTTTGGtagagacgggggttccatattggccaggtggtctccccctcc
 taatcaggtgatctaccaccttgccctcccaattgctgggattacaggtgtaaccactgctccctccctgtcctctgattttaaataa
 ctataccagcaggaggtcagacacagcataggtacctggccatgcccacgggtggacatttgagttgcttggcactgtcct
 ctcatgctgggtccactcagtagatgctgttgaattcctgggcctagggctgtgccagctgctcgtcccgtcacctctggtctctctc
 ctccatatttagctgtttcctcatgagaatgtccaaatfcgaaattctatftaaccattatatttactgtttgctattatctctgccccagta
 gattgttagctccagaagagaaggtatgcttttctttagatagatgcccactgctgtgacatctctggacatgttacaggcaaca
 actactgtggaattggtgaatgcatgaatagaagaatgagtgatgaatgaatagacaataggcagaaatccagcctcaaagagcttacag
 tctgtaagaggaataaaatgctgcaaatagccacaggacaggtcaaaggaaggagggctatttccagctgagggcaccccatcagga
 aagcaccacagacttctacaactactagacacatctcatgcttttacttctatcaatggatgctcctcctggagaataatccccaaagt
 aaactacttagcactccagttaggtagatccttgtgactcttgggtttcagagatcatcaaccagtgcaacaatcccccatcaatacaca
 gcagtgctgccccctccccccgaggtcttccgagggccttctccgtgctgaacccctggacatcatatggcaactgaagtgtcc
 aacgagatataaggaagtgaacacgatgtacactgaaacgtgaatacaaatatgcagcatgaagtgctcgggttactaaccgagctac

CTTGGCTCATCTTGGCTGTGATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCCTAA
 AGGTCCACTGCGTATGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTC
 CTGCTCTGATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACC
 CTGAAGCCCAACGGAGAGTGTCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAA
 AGGGAGAGCCAGGATACAGTTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATG
 GGAAGCCCAGAGGGACAGCCACCTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAG
 CCGCTGTCCAGGAAGTGTCCAGCTCCATCCTGGCCGGCGAAGACCCCGAAGAAAGG
 GGAGTAAAACCTTGGACTGGGAGATTTACATCTTCTACAGTGTTCTCGTTGGCAAAGCC
 AGCGCAACAGCTAGCGGAGACTGGAACACAACAATAGCCTGTTTCGTAGCCATCTT
 AATTGGCCTGTGCCTTACACTTCTGCTCCTGGCCATCTTCAAGAAGGCCCTGCCAGC
 CCTGCCTATCAGCATCACCTTCGGGCTTGTCTTCTACTTTGCCACCGATTATCTGGTG
 CAGCCCTTCATGGACCAGCTGGCCTTCCACCAGTTTTACATCTAGtaagcggccgcccctagggg
 gctcctcgagggggtggcatccctgtgaccctccccagtgcctcctggccctggaagtgccactccagtcccaccagcctgtccta
 ataaaaltaagtgcatcatttctgctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagggggg
 aagacaacctgtagggcctcggggtctattgggaaccaagctggagtgcatggcacaatcttggtcactgcaatctccgctcctggg
 ttcaagcgattctcctgcctcagcctcccagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttggtttttggtagagacggg
 gtttcaccatattggcagcgtggtctccccctctaatactcaggtgatctaccaccttggectcccaattgctgggattacagcgtgaac
 cactgctccctcctgtcctctgattttaaataactataaccagcaggaggacgtccagacacagcataggtacctggccatgcccacc
 ggtgggacatttgagtgcttgctggcactgtcctctcatgcgtgggtccactcagtagatgctgtgaattcctgggcttagggctgtgcc
 agctgectgctcccgtcaccttctgcttctctcctccatatcttagctgtttctcctatgagaatgtccaaattcgaaattctatftaacat
 tataatftactgtttgctattatctctgccccagtagattgtagctccagaagagaaaggtatgcttttcttatctagatatgcccactg
 cctggtacaatctctggcactgttacaggcaacaactactgtggaattggtgaatgcatgaatagaagaatgagtgaaatgaatgaatagac
 aataggcagaaatccagcctcaaagagcttacagtctgtaagaggaataaaatgtctgcaaatagccacaggacaggtcaaaggaagga
 ggggctatttccagctgagggcaccatcaggaaagcaccagacttctacaactactagacacatctcgatgcttttcacttctctatca
 atggatgctcctggagaataatccccaaagtgaattacttagcacgtccagtttaggtagatcctgtgtacttctggttgttcagagatca
 tcaaccagtgcaacaatcccccatcaatacacagcagtgctgcccctctcccccgaggtcttccgaggeccttctccgtgctgcaac
 cccctggacatatcatatggcaactgaagtgtccaacgagatataggaagtgaacacgatgtactgaaactgcaatacaaatatgca
 gcatgaagtgectcggttactaaccgagctacgtgggtgcttctttctaccacttcttaatgcctatggacacctcattctgtggtgaa
 gttcctgtgtcaattcccccatctcattgaacatcctgtgtaggacctcaccctgtcctgctagctttgcaactgaggcaagttctgtccat
 gcctagtagtgcaccaccttactagatgagacttctaaagagcttggcatggaaggaaagcccgggggcttggagccatcacttaga
 aactgggagagctccaggcaagccacctcatcttagggataacagggtaatggcgcggggccgaggaaccctagtgatggagttggcc
 actccctctctgcgctcgtcgtcactgaggccgggagaccaaggtcggcgagcggggcttggccggggcctcagtgag
 cgagcgagcgcgagctgctgcagg

SEQ ID NO: 47

Кассета экспрессии для получения самокомплементарного AAV, содержащая нативные и модифицированные ITR AAV2 (1-105, 2386-2526), промотор СВА (подчеркнутый, 113-766), интрон малого вируса мышей (776-867), HA-метку (884-910), кодон-оптимизированный человеческий пресенилин-1v1.5 (SEQ ID NO: 37, 881-2311 верхним регистром), последовательность полиаденилирования бета-глобина кролика (2319-2367).

ctgcgcgctcgtcgtcactgagccgccccgggcaaagccccggggtcgggacacctttggtcgccccggcctcagtgagc
 gagcgagcgcgcagagaggggagtgagatcctcgacattgatttgaactagttattaatagtaataacacggggcattagttcatagccca
tatatgaggttccgcgttacataactfacggtaaatggccccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtat
gttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagfacatcaagtgtatc
atagccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttg
gcagfacatctacgtattagtcacgctattaccatgtcggggccacgttctgcttcaacttccccatctcccccccccccccccccaatttg
tatttatttttttaattttttgtgcagcagatggggggcggggggggggggcgcgccagggggggggggcgggggcgagggggcg
ggcgggggcgagggcgagaggtgccccggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtcttttatggcgagggcgcgcgcgcg
cgcgccctataaaaaagcgaagcgcgcggcggggggcaagcttcgtaagaggttaaggggttaagggatggttggttgggggtatt
 aatgtttaattacctgttttacaggcctgaaatcacttggtttaggttgggctagccgccaccATGtaccatacagatgttcagattacgct
 ACAGAATTACCTGCCCCCTTGAGCTACTTCCAGAATGCACAGATGAGCGAGGACAA
 CCACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAACAGAGAACGGCAGGAACACA
 ACGACAGGCGGAGCCTGGGCCACCCTGAGCCCCTGTCTAATGGAAGACCCCAGGGT
 AACAGCAGACAGGTGGTGGAAACAAGATGAGGAAGAGGACGAGGAGCTGACCCTGA
 AGTACGGCGCCAAGCACGTGATCATGCTCTTCGTGCCCGTGACTCTCTGCATGGTGG
 TGGTGGTGGCTACAATCAAGAGCGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTA
 ATCTATACCCCATTCACAGAAGACACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTC
 AATCCTGAATGCCGCCATCATGATCAGCGTCATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGT
 GGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAAGGTCATCCATGCCTGGCTGATCATATCATC
 TCTGTTGCTGCTGTTCTTTTTTAGCTTCATTTACCTGGGCGAAGTGTTTAAACCTAT
 AACGTTGCCGTGGACTACATTACTGTTGCCCTCCTGATCTGGAACCTTCGGCGTGGTG
 GGCATGATTTCCATTCACTGGAAAGGCCCTGAGACTGCAGCAGGCATACCTCATT
 ATGATCTCCGCCCTCATGGCCCTGGTGTTCATCAAGTACCTGCCCGAGTGGACTGCT
 TGGCTCATCTTGGCTGTGATCTCCGTGTATGATTTAGTGGCTGTTCTGTGTCCTAAAG
 GTCCACTGCGTATGCTGGTGGAAACAGCTCAGGAAAGAAATGAAACACTGTTTCCT
 GCTCTGATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGCTCGTGAATATGGCCGAAGGAGACCCT
 GAAGCCCAACGGAGAGTGTCCAAAACTCCAAGTATAACGCCGAGAGCACAGAAA
 GGGAGAGCCAGGATACAGTTGCCGAGAATGACGATGGCGGCTTCAGTGAGGAATGG
 GAAGCCAGAGGGACAGCCACCTGGGGCCTCACAGAAGCACCCCTGAGTCTAGAGC
 CGCTGTCCAGGAACTGTCCAGCTCCATCCTGGCCGCGAAGACCCCGAAGAAAGGG
 GAGTAAACTTGGACTGGGAGATTTTCATCTTCTACAGTGTCTCGTTGGCAAAGCCA
 GCGCAACAGCTAGCGGAGACTGGAACACAACAATAGCCTGTTTCGTAGCCATCTTA
 ATTGGCCTGTGCCTTACACTTCTGCTCCTGGCCATCTTCAAGAAGGCCCTGCCAGCC
 CTGCCTATCAGCATCACCTTCGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACCGATTATCTGGTGC
 AGCCCTTCATGGACCAGCTGGCCTTCCACCAGTTTTTACATCTAGcgcggccgaataaaagatcttta
 ttttcattagatctgtgttggttttgtgtgtagggataacagggtaataggaaccctagtgatggagtggccactccctctctcgcgctc
 gctcgtcactgagccggggcgaccaaggtcggcgacggcggtttggcgggggcctcagtgagcgagcgagcgcgagct
 gcctgcagg

[190] Любые и все ссылки и цитаты на другие документы, такие как патенты, патентные заявки, патентные публикации, журналы, книги, документы, веб-контент,

которые были сделаны в этом описании, настоящим включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

[191] Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные детали некоторых вариантов его осуществления в приведенных выше примерах, следует понимать, что модификации и варианты охватываются сущностью и объемом изобретения. Соответственно, данное изобретение ограничено только следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39; или имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO: 39, и кодирующий тот же полипептид, который кодируется каждым из вышеперечисленных, при этом полинуклеотид не встречается в природе.

2. Выделенный полинуклеотид по п. 1, имеющий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37.

3. Выделенный полинуклеотид по п. 1, имеющий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39.

4. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащая:

(I) полинуклеотид, кодирующий пресенилин 1, при этом полинуклеотид содержит любой из:

(a) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, или

(b) полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, и

(II) один или более регуляторных элементов, функционально связанных с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин 1.

5. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 4, отличающаяся тем, что один из регуляторных элементов представляет собой сигнал инициации трансляции Kozak.

6. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 5, отличающаяся тем, что сигнал инициации трансляции Kozak содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 5.

7. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-6, отличающаяся тем, что один из регуляторных элементов представляет собой последовательность инсулятора хроматина.

8. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 7, отличающаяся тем, что последовательность инсулятора хроматина содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 4.

9. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-8, отличающаяся тем, что один из регуляторных элементов представляет собой нейрон-специфический промотор.

10. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что нейрон-специфический промотор содержит (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:3; (iii) функциональный фрагмент SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3; или (iv) полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный (i), (ii) или (iii).

11. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-10, отличающаяся тем, что один или более регуляторных элементов независимо выбраны из

элемента стабильности мРНК.

12. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 11, отличающаяся тем, что элемент стабильности мРНК содержит (i) полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11; (ii) полинуклеотид с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11.

13. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 11, отличающаяся тем, что элемент стабильности мРНК расположен на 3'-конце открытой рамке считывания полинуклеотида, кодирующего пресенилин 1, или на 5'-конце сигнала полиаденилирования.

14. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 13, содержащая первый и второй элемент стабильности мРНК, при этом первый элемент стабильности мРНК расположен на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего пресенилин 1, а второй элемент стабильности мРНК расположен на 5'-конце сигнала полиаденилирования.

15. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-14, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий пресенилин 1, представляет собой полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 37.

16. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-14, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий пресенилин 1, представляет собой полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 39.

17. Вектор, содержащий кассету экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-16.

18. Вектор по п. 17, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор.

19. Вектор по п. 18, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор.

20. Вектор по п. 19, отличающийся тем, что вектор AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVDJ, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2/1, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/rh10, AAV2/11 или AAV2/12.

21. Вектор по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что вектор содержит: промотор, выбранный из промотора CAG, промотора пресенилина-1, промотора убиквитина С, промотора СВА, промотора синапсина-1, промотора PGK и промотора EF1 α , функционально связанный с:

последовательностью, кодирующей пресенилин-1, выбранной из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:39, или полинуклеотидом, обладающим по меньшей мере 95% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей, кодирующих PSEN-1, и кодирующим аминокислотную последовательность PSEN-1 дикого типа; и

последовательностью полиаденилирования, выбранной из последовательности полиаденилирования гормона роста человека и последовательности полиаденилирования β -глобина кролика.

22. Вектор по п. 21, дополнительно содержащий интрон, выбранный из интрона бета-глобина человека (дикого типа или синтетического) или интрона мелкого вируса мышей, при этом интрон расположен между промотором и кодирующей последовательностью PSEN-1.

23. Вектор по п. 22, отличающийся тем, что вектор содержит:

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1200 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1221-1786 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1899-3299 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3330-3806 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4553-4693 SEQ ID NO:41 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1323 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1344-1909 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1983-3416 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3447-3923 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4554-4694 SEQ ID NO:42 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-890 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 911-1476 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1550-2983 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3014-3490 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4553-4694 SEQ ID NO:43 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

нуклеотиды 1-141 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-1415 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1436-2001 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2075-3508 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 3539-4015 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4500-4640 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, из SEQ ID NO:44, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 95%;

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-664 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 684-1249 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1323-2756 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, 2787-3263 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4533-4673 SEQ ID NO:45 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%;

нуклеотиды 1-141 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 237-684 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 705-1270 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 1344-2777 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2808-3284 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 4554-4695 SEQ ID NO:46 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%; или

нуклеотиды 1-105 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 113-766 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 776-867 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 881-2311 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, нуклеотиды 2319-2367 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%, и нуклеотиды 2386-2526 SEQ ID NO:47 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 95%.

24. Вектор по п. 23, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-47 или нуклеотидную последовательность, имеющую 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 41-47.

25. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-16, отличающаяся тем, что регуляторные элементы, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин 1, содержат:

сигнал инициации трансляции Kozak;
нейрон-специфический промотор;
последовательность инсулятора хроматина;
элемент стабильности мРНК, расположенный на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего пресенилин 1; и
элемент стабильности мРНК, расположенный 5'-конце сигнала полиаденилирования.

26. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 25, отличающаяся тем, что:
сигнал инициации трансляции Kozak содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 5;

последовательность инсулятора хроматина содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 4;

элемент стабильности мРНК, расположенный на 3'-конце открытой рамки считывания полинуклеотида, кодирующего пресенилин 1, содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10;

по меньшей мере один элемент стабильности мРНК, расположенный на 5'-конце сигнала полиаденилирования, содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:11; и

нейрон-специфический промотор содержит полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3.

27. Кассета экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-6, отличающаяся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим пресенилин 1, представляет собой убиквитиновый промотор.

28. Способ лечения нейродегенеративного заболевания, расстройства или состояния, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, вектора по любому из пп. 17-24.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, семейную болезнь Альцгеймера (СБА), СБА, опосредованную пресенилином-1 (PSEN-1), лобно-височную деменцию, лобно-височную долевую дегенерацию, болезнь Пика, деменцию с тельцами Леви, потерю памяти, когнитивные нарушения или легкие когнитивные нарушения.

30. Способ лечения семейной болезни Альцгеймера (СБА) или СБА, опосредованной пресенилином-1 (PSEN-1), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, вектора по любому из пп. 17-24.

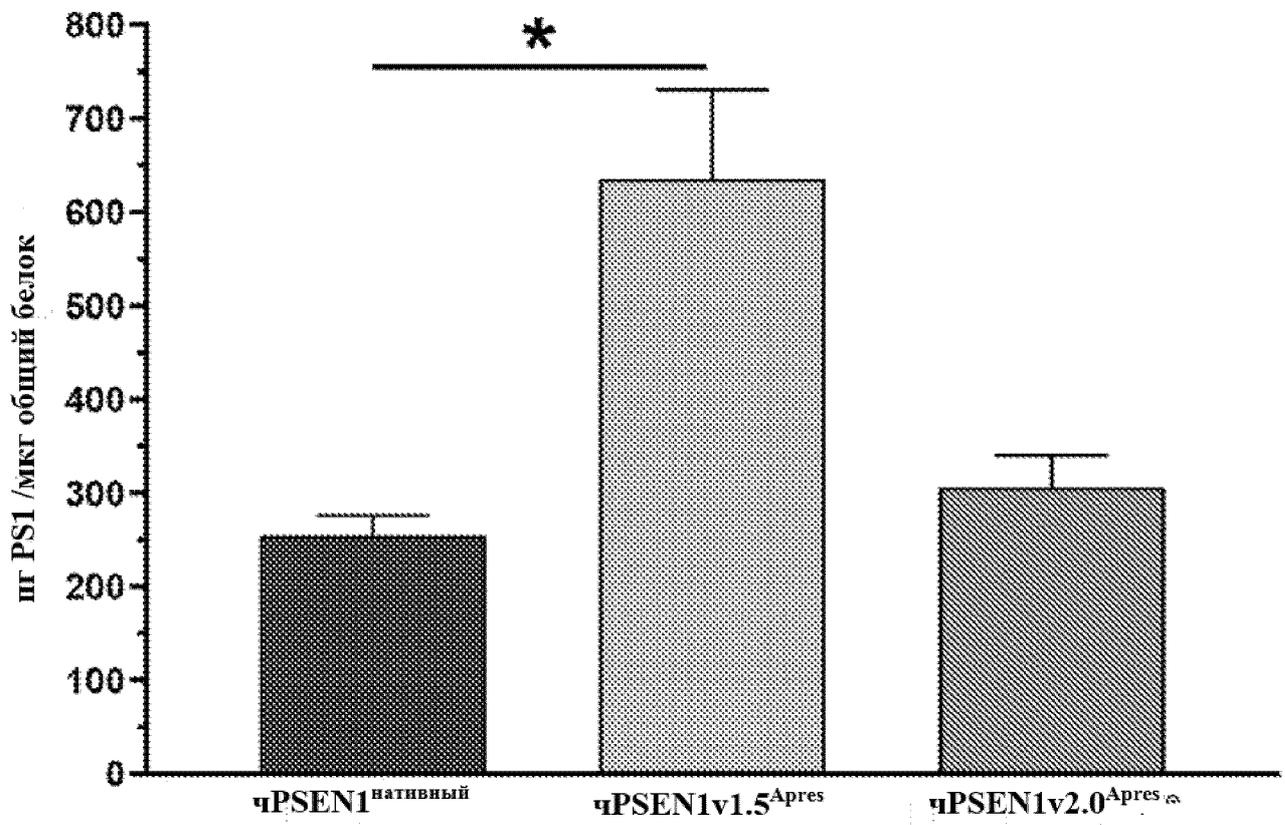
31. Способ получения белка пресенилина-1, включающий:

трансформацию клетки-хозяина вектором, содержащим оптимизированный полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, или SEQ ID NO:39; или вектором, содержащим полинуклеотид, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, или SEQ ID NO:39, и кодирующим тот же полипептид, который кодируется каждым из вышеперечисленных; и

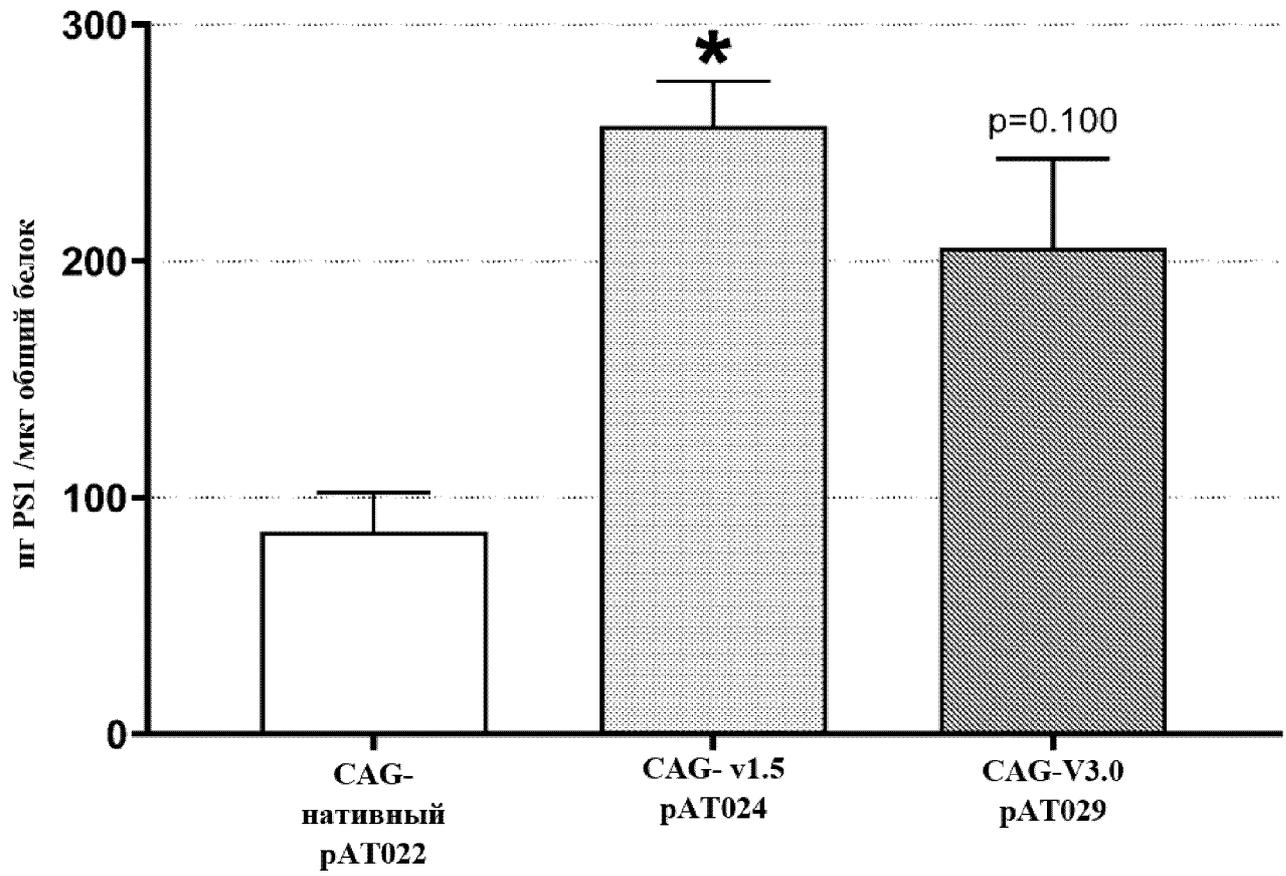
культивирование клетки в условиях и в течение времени, обеспечивающих экспрессию белка пресенилина-1, при этом экспрессия белка пресенилина-1, кодируемого оптимизированным полинуклеотидом, в клетке-хозяине превышает уровень экспрессии белка пресенилина-1, кодируемого полинуклеотидом дикого типа, в клетке-хозяине, в результате чего образуется белок пресенилин-1.

По доверенности

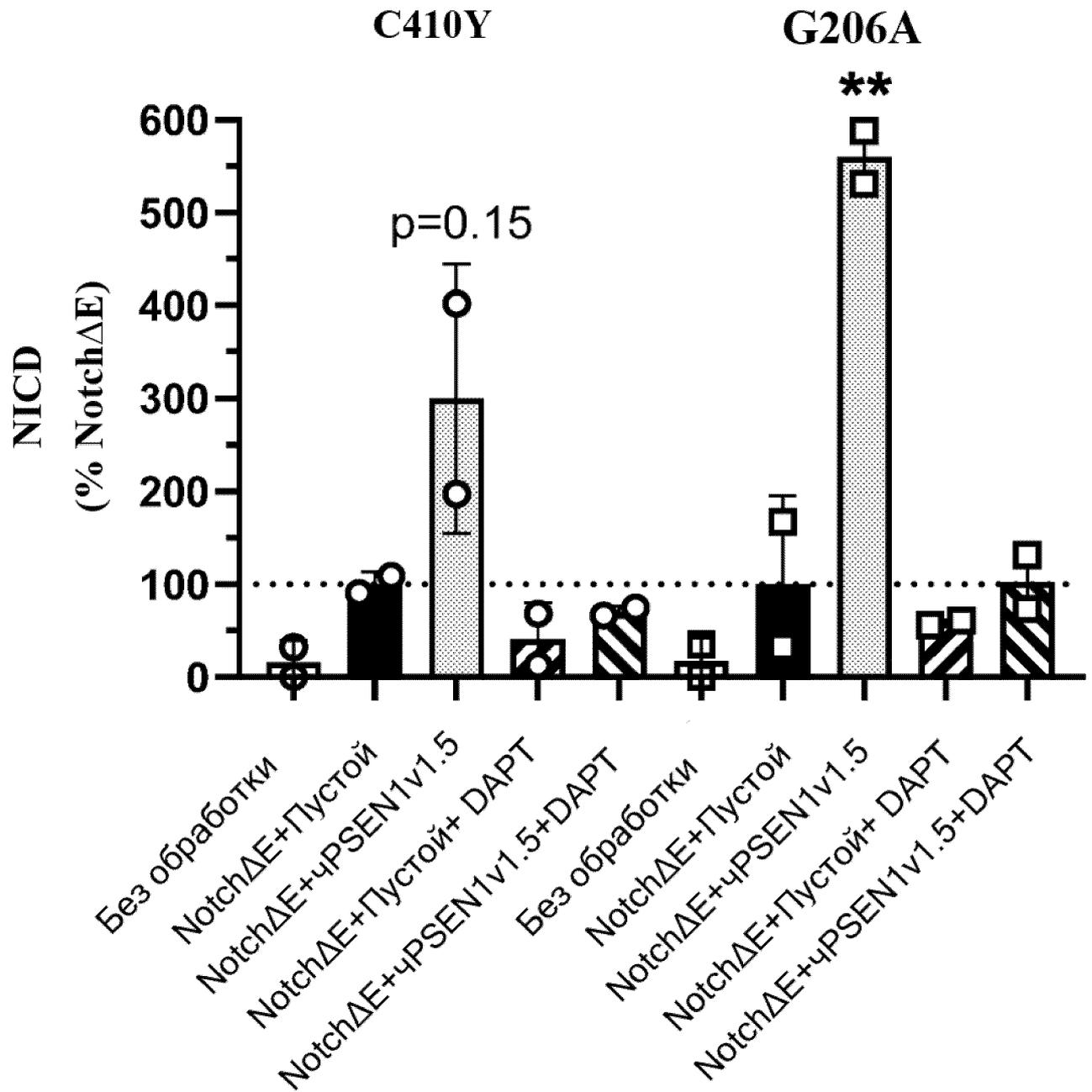
1/4



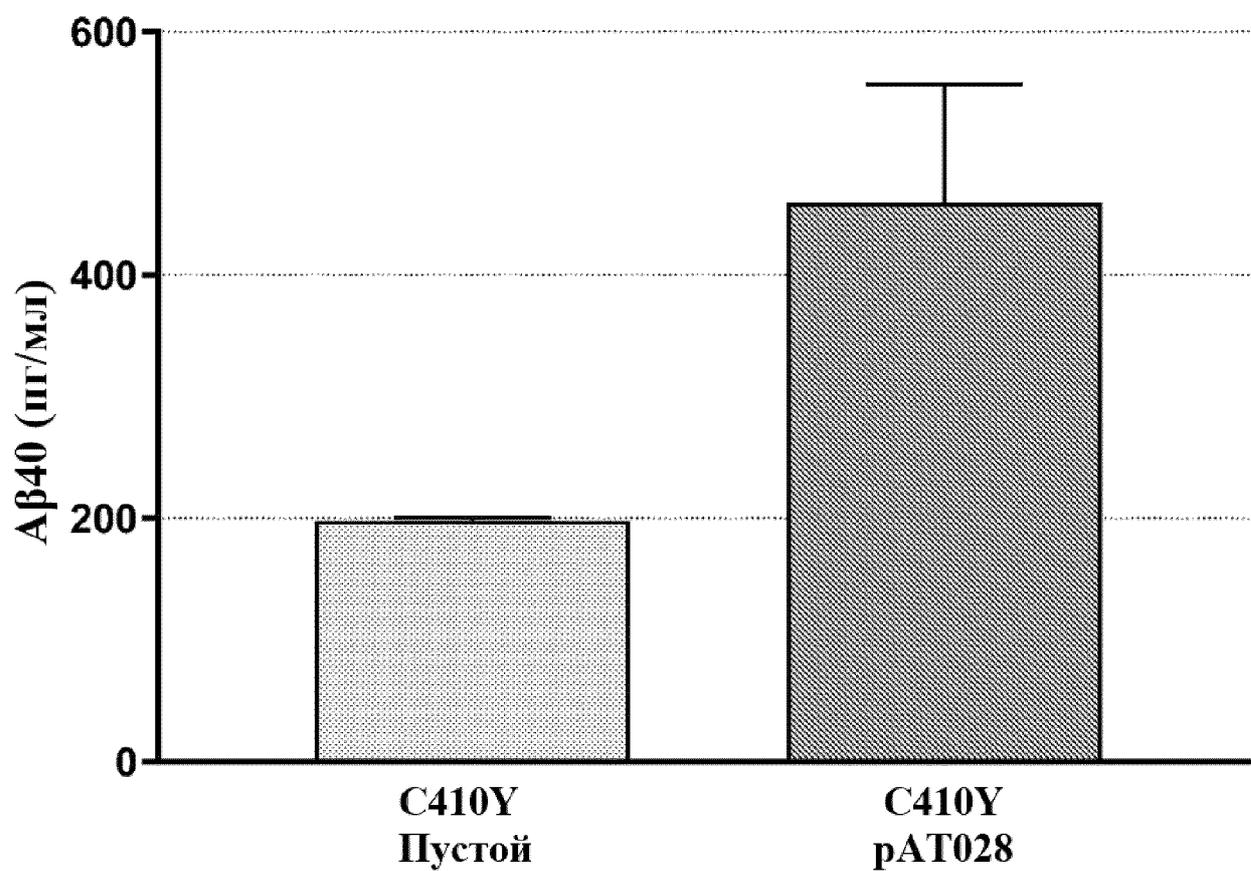
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4