

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390282** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.22

(22) Дата подачи заявки
2021.07.08

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ИНТРОННЫЕ ФРАГМЕНТЫ

(31) 10-2020-0084038; 17/365,884

(32) 2020.07.08; 2021.07.01

(33) KR; US

(86) PCT/KR2021/008693

(87) WO 2022/010277 2022.01.13

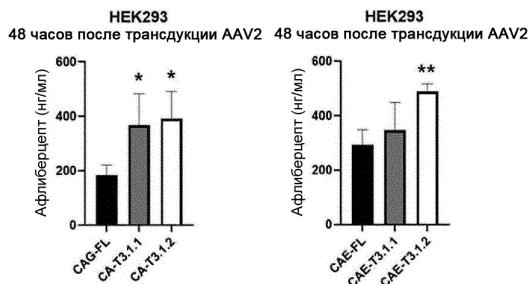
(71) Заявитель:
НЬЮРЭКЛ ДЖЕНЕТИКС ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:

Кон Хун Юн, Ким Чон-Мук, Ким Чи
Ён, Син Сонхва, Ли Кюнвон, Хан Чу
Сок (KR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Обеспечиваются новые интронные фрагменты. Интронные фрагменты позволяют увеличивать экспрессию генов до уровней, равных или превышающих уровни, достигаемые полноразмерным интроном, сохраняя при этом свою способность увеличивать экспрессию генов даже в комбинации с различными типами промоторов и доноров сплайсинга. В частности, интронные фрагменты позволяют загружать более крупные трансгены при использовании в системах доставки генетической информации, размер которых ограничен, например, в аденоассоциированных вирусах (AAV) и рабдовирусах. Следовательно, ожидается, что использование интронных фрагментов расширит спектр терапевтических генов.



A1

202390282

202390282

A1

НОВЫЕ ИНТРОННЫЕ ФРАГМЕНТЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым интронным фрагментам (т.е. нетранслируемым нуклеиновокислотным последовательностям), которые позволяют увеличивать экспрессию трансгена.

Предшествующий уровень техники

Эукариотические пре-мРНК состоят из экзонов, содержащих фактическую генетическую информацию, и интронов, расположенных в промеж между экзонами и имеющих поли-А последовательности на своих 3'-концах. Интроны влияют на альтернативный сплайсинг мРНК и регулируют продукцию белков (Huh, G.S., et al., «Regulation of Alternative pre-mRNA Splicing by a Novel Repeated Hexanucleotide Element», *Genes Dev* 8(13):1561-74 (Jul. 1994); Parenteau, J., et al., «Introns Within Ribosomal Protein Genes Regulate the Production and Function of Yeast Ribosomes», *Cell* 147(2):320-31 (Oct. 2011)). Также сообщалось, что трансгены, содержащие интрон, у мышей транскрибируются в 10-100 раз эффективнее, чем те же гены, в которых отсутствуют интроны, и даже влияют на выживаемость мышей (Brinster, R.L., et al., «Introns Increase Transcriptional Efficiency in Transgenic Mice», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(3):836-40 (Feb. 1988); Parenteau, J., et al., «Introns Are Mediators of Cell Response to Starvation», *Nature* 565(7741):612-617 (Jan. 2019)). В частности, интроны усиливают продукцию белков с помощью механизма, называемого интрон-опосредованным усилением (IME). Большинство интронов, используемых для достижения эффекта IME, являются довольно длинными, что ограничивает их фактическое использование. Например, поскольку аденоассоциированные вирусы (AAV), которые недавно привлекли внимание в качестве векторов для генной терапии, могут нести только генетическую информацию длиной до 4,7 т.п.н., использование длинных интронов значительно ограничивает диапазон генов, которые могут быть доставлены. Следовательно, крайне необходимы короткие интронные фрагменты, включая те, которые могут быть использованы с векторами AAV, сохраняя при этом их способность увеличивать экспрессию белка.

Описание изобретения

Техническая проблема, решаемая изобретением

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет для Корейской патентной заявки № 10-2020-0084038, поданной 8 июля 2020 года, и заявки на патент США № 17/365,884,

поданной 1 июля 2021 года, содержание которой настоящим включено посредством ссылки во всей полноте.

Изложение сущности изобретения

В настоящей заявке представлен изолированный полинуклеотид, содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 874-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 57.

В настоящей заявке представлен изолированный полинуклеотид, содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности с последовательностью нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из последовательности нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 3.

В настоящей заявке представлен изолированный полинуклеотид, содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности с последовательностью нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая

нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из последовательности нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 5'-конце («5'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, соответствующих положениям 1-873 в SEQ ID NO: 1 в 5'-области нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности. В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 3'-конце («3'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность описанного в настоящей заявке полинуклеотида имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности с последовательностью (i) нуклеотидов 871-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 58), (ii) нуклеотидов 861-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 59), (iii) нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 60), (iv) нуклеотидов 851-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 61), (v) нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 2), (vi) нуклеотидов 821-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 63), (vii) нуклеотидов 811-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 64), (viii) нуклеотидов 808-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 65), (ix) нуклеотидов 801-924 из

SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 66), (x) нуклеотидов 751-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 67), (xi) нуклеотидов 721-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 68), (xii) нуклеотидов 701-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 69), (xiii) нуклеотидов 651-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 70), (xiv) нуклеотидов 601-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 71), (xv) нуклеотидов 570-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 72), (xvi) нуклеотидов 551-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 73), или (xvii) нуклеотидов 501-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 74).

В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, дополнительно содержит трансген. В некоторых аспектах трансген способен транслироваться в полипептид.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность полинуклеотида, описанного в настоящей заявке, способна увеличивать экспрессию трансгена при трансляции по сравнению с эталонной экспрессией, где эталонная экспрессия включает экспрессию соответствующего трансгена при трансляции при отсутствии нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности и/или в присутствии нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность способна увеличивать экспрессию трансгена по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, или, по меньшей мере примерно в 10 раз по сравнению с эталонной экспрессией.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит промотор. В некоторых аспектах промотор включает промотор цитомегаловируса (CMV), промотор EF-1 α , промотор β -актина, промотор GAPDH, промотор HSP70, промотор GRP78, промотор eIF4A, промотор AAT, промотор TTR, промотор GFAP, промотор SV40, промотор SYN1, промотор GRK, промотор Rho или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах промотор является промотором EF-1 α . В некоторых аспектах

промотор EF-1 α содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах промотор включает промотор CMV. В некоторых аспектах промотор CMV содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 5 или 6. В некоторых аспектах промотор включает промотор β -актина. В некоторых аспектах промотор β -актина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, дополнительно содержит энхансер. В некоторых аспектах энхансер включает энхансер цитомегаловируса (CMV), ранний энхансер SV40, энхансер аденовируса 5 E1A, регуляторную область энхансера-1 (Eh-1) HBV, длинную контрольную область E6/7 (LCR) HPV-16 или -18, длинный терминальный повтор (LTR) HIV-1 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах энхансер является энхансером CMV. В некоторых аспектах энхансер CMV содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4.

В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, дополнительно содержит донорную последовательность сплайсинга. В некоторых аспектах донорная последовательность сплайсинга расположена выше нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности. В некоторых аспектах донорная

последовательность сплайсинга содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 9 или 10.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит нуклеотидную последовательность экзона 2 (E2) EF-1 α . В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность экзона 2 (E2) EF-1 α имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 11.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит последовательность экзона 1 (E1) цитомегаловируса (CMV), последовательность E1 EF-1 α , последовательность E1 β -актина или любую их комбинацию. В некоторых аспектах последовательность E1 CMV имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах последовательность E1 EF-1 α имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах последовательность E1 β -актина имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 14 или 15.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень для микроРНК (miRNA), специфичную для иммунной клетки. В некоторых аспектах микроРНК включает miR142-3p, miR142-5p, или и то, и другое. В некоторых аспектах последовательность-мишень для микроРНК содержит антисмысловой олигонуклеотид, антагонист, молекулу короткой шпилечной РНК (кшРНК), молекулу малой интерферирующей РНК (миРНК), рибозим, олигонуклеотид пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), олигонуклеотид заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах последовательность-мишень для микроРНК комплементарна полноразмерной или частичной последовательности miR142-3p или miR142-5p. В некоторых аспектах последовательность-мишень для микроРНК содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит по меньшей мере две последовательности-мишени, по меньшей мере три последовательности-мишени, по меньшей мере четыре последовательности-мишени, по меньшей мере пять последовательностей-мишеней, по меньшей мере шесть последовательностей-мишеней, по меньшей мере семь последовательностей-мишеней, по меньшей мере восемь последовательностей-мишеней, по меньшей мере девять последовательностей-мишеней, или по меньшей мере десять последовательностей-мишеней. В некоторых аспектах две или более последовательности-мишени являются одинаковыми. В некоторых аспектах каждая из последовательностей-мишеней отличается.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WPRE). В некоторых аспектах последовательность WPRE имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, дополнительно содержит одну или несколько последовательностей полиаденилирования (pA). В некоторых аспектах последовательность pA имеет по меньшей мере примерно

70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 19-22.

Когда полинуклеотид содержит трансген, в некоторых аспектах трансген кодирует полипептид дикого типа или любой его вариант, гибридный белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу на основе РНК или любую их комбинацию. В некоторых аспектах трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах трансген кодирует гибридный белок. В некоторых аспектах гибридный белок содержит ингибитор фактора роста эндотелия сосудов («VEGF»). В некоторых аспектах ингибитор VEGF включает афлиберцепт. В некоторых аспектах, где трансген представляет собой молекулу на основе РНК, молекула на основе РНК включает микроРНК, кшРНК, миРНК, рибозим или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, представляет собой рекомбинантную экспрессионную конструкцию.

Также в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий (i) трансген и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансер CMV, указанный в SEQ ID NO: 4; (2) промотор, выбранный из последовательности промотора CMV, указанной в SEQ ID NO: 5 или 6, последовательности промотора EF-1 α , указанной в SEQ ID NO: 7, или последовательности промотора куриного β -актина, указанной в SEQ ID NO: 8; (3) последовательность экзона 1 (E1), выбранную из последовательности E1 CMV, указанной в SEQ ID NO: 12, последовательности E1 EF-1 α , указанной в SEQ ID NO: 13, или последовательности E1 куриного β -актина, указанной в SEQ ID NO: 14 или 15; (4) донорную последовательность сплайсинга, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10; (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу, или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 57; и (6) последовательность EF-1 α E2, указанную в SEQ ID NO: 11.

Представленный в настоящей заявке вектор содержит любой из полинуклеотидов

настоящего раскрытия. В некоторых аспектах вектор является вирусным вектором. В некоторых аспектах вирусный вектор включает аденовирус (например, генно-инженерный аденовирус), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус, вирус типа SV40, полиомавирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус папилломы, вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины, вирус полиомиелита, бакуловир, ретровирус, поксвирус или любую их комбинацию. В некоторых аспектах вирусным вектором является AAV.

В некоторых аспектах вирусный вектор, описанный в настоящей заявке, предназначен для использования в генной терапии. В некоторых аспектах вирусный вектор предназначен для использования при экспрессии полипептида, кодируемого трансгеном полинуклеотида, описанного в настоящей заявке. В некоторых аспектах трансген содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

Представленная в настоящей заявке клетка содержит любой из полинуклеотидов или векторов, описанных здесь.

Также в настоящей заявке представлен способ получения рекомбинантной вирусной частицы, включающий трансдукцию клетки любым из векторов, описанных здесь, и конструкцией, содержащей гены гер и сар. В некоторых аспектах способ дополнительно включает выделение полученной рекомбинантной вирусной частицы.

В настоящей заявке представлена рекомбинантная вирусная частица, полученная вышеуказанными способами. Также в настоящей заявке представлена рекомбинантная вирусная частица, содержащая (а) капсидный белок и (b) любой из векторов, описанных здесь. В некоторых аспектах рекомбинантная вирусная частица представляет собой аденоассоциированный вирус (AVV). В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAVrh10. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV2. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV8. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV5. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV9.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую (а) любой из полинуклеотидов, векторов, клеток или рекомбинантных вирусных частиц, описанных в настоящей заявке; и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Также в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантную аденоассоциированную вирусную частицу и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где рекомбинантная аденоассоциированная вирусная частица содержит (а) капсидный белок AAV типа 8 и (b) полинуклеотид, включающий (i) трансген, который содержит нуклеотидную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность цитомегаловируса (CMV), указанную в SEQ ID NO: 4; (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8; (3) последовательность экзона 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15; (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10; (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 57; и (6) последовательность экзона 2 EF-1 α (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

В настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция для профилактики или лечения офтальмологического заболевания, содержащая рекомбинантную аденоассоциированную вирусную частицу и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где рекомбинантная аденоассоциированная вирусная частица включает (a) капсидный белок AAV типа 8 и (b) полинуклеотид, содержащий (i) трансген, который включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность цитомегаловируса (CMV), указанную в SEQ ID NO: 4; (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8; (3) последовательность экзона 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15; (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10; (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 57; и (6) последовательность EF-1 α экзона 2 (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых аспектах офтальмологическое заболевание включает диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, макулярную дегенерацию, дегенерацию сетчатки, макулярный отек, отек сетчатки, отечность желтого пятна или их комбинации. В некоторых аспектах макулярная дегенерация включает возрастную макулярную дегенерацию (ВМД).

В настоящей заявке представлен способ увеличения экспрессии трансгена в клетке, включающий обеспечение контакта клетки с любым из полинуклеотидов, векторов или рекомбинантных вирусных частиц, описанных здесь. В некоторых аспектах контакт осуществляют *in vivo*. В некоторых аспектах способ включает введение полинуклеотида, вектора или рекомбинантной вирусной частицы субъекту перед контактом. В некоторых

аспектах контакт осуществляют *ex vivo*. В некоторых аспектах экспрессия трансгена увеличивается по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, или по меньшей мере примерно в 10 раз или более, по сравнению с соответствующей экспрессией в контрольной клетке, где контрольная клетка контактирует с полинуклеотидом, вектором или рекомбинантной вирусной частицей, где либо отсутствует нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, либо содержится нуклеотидная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 1.

В настоящей заявке представлен способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий применение у субъекта любого из полинуклеотидов, векторов или рекомбинантных вирусных частиц, описанных здесь. В некоторых аспектах заболевание или расстройство включает офтальмологическое заболевание. В некоторых аспектах офтальмологическое заболевание включает диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, макулярную дегенерацию, дегенерацию сетчатки, макулярный отек, отек сетчатки, отечность желтого пятна или их комбинации. В некоторых аспектах макулярная дегенерация включает возрастную макулярную дегенерацию (ВМД). В некоторых аспектах способ включает применение у субъекта дополнительного терапевтического агента.

Аспекты

Аспект 1. Интронный фрагмент фактора элонгации-1 альфа (EF-1 α) для экспрессии трансгена, содержащий последовательность, где смежные или несмежные нуклеотиды в последовательности интрона EF-1 α , указанной в SEQ ID NO: 1, усечены, где (a) интронный фрагмент EF-1 α по существу содержит нуклеотиды в положениях 874-924 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1; и (b) интронный фрагмент EF-1 α увеличивает экспрессию трансгена, когда присутствует в экспрессионной конструкции, по сравнению с интронным фрагментом, состоящим только из нуклеотидов в положениях 874-924 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

Аспект 2. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 1, в котором усечение

Аспект 4. Интронный фрагмент EF-1α согласно аспекту 3, где усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-860 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 6. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 5, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-850 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 7. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 6, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-829 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 8. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 7, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в

Аспект 10. Интронный фрагмент EF-1α согласно аспекту 9, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-800 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 12. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 11, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-720 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 14. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 13, в котором усечение

смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-650 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 15. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 14, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-600 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 16. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 15, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-569 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 17. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 16, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-550 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 18. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 17, в котором усечение смежных или несмежных нуклеотидов включает усечение смежных нуклеотидов в положениях 1-500 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами, или вставку из различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов.

Аспект 19. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 7, который содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2.

Аспект 20. Интронный фрагмент EF-1 α согласно аспекту 5, который содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3.

Аспект 21. Рекомбинантная экспрессионная конструкция для экспрессии трансгена, содержащая (a) трансген и (b) контрольный элемент, функционально связанный с

трансгеном и содержащий энхансер, промотор и интронный фрагмент EF-1 α в соответствии с аспектом 1, где трансген транскрибируется и транслируется в клетке-хозяине.

Аспект 22. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, в которой энхансер представляет собой энхансер цитомегаловируса (CMV).

Аспект 23. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 22, в которой энхансер цитомегаловируса (CMV) содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4.

Аспект 24. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, в которой промотор выбран из группы, состоящей из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора EF-1 α и промотора β -актина.

Аспект 25. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 24, в которой промотор CMV содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или 6.

Аспект 26. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 24, в которой промотор EF-1 α содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7.

Аспект 27. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 24, в которой промотор β -актина содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8.

Аспект 28. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, в которой донорная последовательность сплайсинга расположена выше от фрагмента интрона EF-1 α .

Аспект 29. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 28, в которой донорная последовательность сплайсинга содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10.

Аспект 30. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, которая содержит последовательность экзона 2 (E2) EF-1 α .

Аспект 31. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 30, в которой последовательность EF-1 α E2 содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11.

Аспект 32. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, которая содержит последовательность экзона 1 (E1) цитомегаловируса (CMV), EF-1 α или β -актина.

Аспект 33. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 32, в

которой последовательность E1 CMV содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12.

Аспект 34. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 32, в которой последовательность E1 EF-1 α содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13.

Аспект 35. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 32, в которой последовательность E1 β -актина содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14 или 15.

Аспект 36. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, дополнительно содержащая одну или несколько последовательностей-мишеней для микроРНК (miRNA), специфичных для иммунных клеток.

Аспект 37. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 36, в которой микроРНК представляет собой miR142-3p или miR142-5.

Аспект 38. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 36, в которой последовательности-мишени для микроРНК выбраны из группы, состоящей из антисмысловых олигонуклеотидов, антагомиров, молекул короткой шпилечной РНК (кшРНК), молекул малой интерферирующей РНК (миРНК), рибозимов, олигонуклеотидов пептидных нуклеиновых кислот (PNA) и олигонуклеотидов заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA), которые имеют последовательности, комплементарные полноразмерной или частичной последовательности miR142-3p или miR142-5p.

Аспект 39. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 38, в которой последовательность-мишень для miR142-3p содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16.

Аспект 40. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 38, в которой количество последовательностей-мишеней для микроРНК составляет от 2 до 6.

Аспект 41. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 40, в которой последовательность-мишень для miR142-3p содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17.

Аспект 42. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, дополнительно содержащая последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WPRE).

Аспект 43. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 42, в которой последовательность WPRE содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

Аспект 44. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21,

дополнительно содержащая одну или несколько последовательностей полиаденилирования (pA).

Аспект 45. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 44, в которой последовательности полиаденилирования выбраны из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 19-22.

Аспект 46. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, в которой контрольный элемент содержит: (1) энхансерную последовательность CMV, указанную в SEQ ID NO: 4; (2) промоторную последовательность CMV, указанную в SEQ ID NO: 5 или 6, промоторную последовательность EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 7 или промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8; (3) последовательность E1 CMV, указанную в SEQ ID NO: 12, последовательность E1 EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность E1 куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 14 или 15; (4) донорную последовательность сплайсинга, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10; (5) последовательность интронного фрагмента EF-1 α по п.1; и (6) последовательность E2 EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 11.

Аспект 47. Рекомбинантная экспрессионная конструкция согласно аспекту 21, в которой трансген содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

Аспект 48. Клетка-хозяин, трансдуцированная рекомбинантной экспрессионной конструкцией согласно аспекту 21.

Аспект 49. Способ получения рекомбинантного вируса, включающий трансдукцию клетки-хозяина рекомбинантной экспрессионной конструкцией согласно аспекту 21 и конструкцией, содержащей гены гер и сар.

Аспект 50. Рекомбинантный вирус, содержащий (a) капсидный белок и (b) рекомбинантную экспрессионную конструкцию в соответствии с аспектом 21.

Аспект 51. Рекомбинантный вирус согласно аспекту 50, который представляет собой аденоассоциированный вирус (AVV).

Аспект 52. Рекомбинантный вирус согласно аспекту 51, в котором серотипом аденоассоциированного вируса является AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAVrh10.

Аспект 53. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантную экспрессионную конструкцию согласно аспекту 21 или рекомбинантный вирус согласно аспекту 50.

Аспект 54. Фармацевтическая композиция согласно аспекту 53, которую применяют для профилактики или лечения офтальмологического заболевания.

Аспект 55. Фармацевтическая композиция согласно аспекту 54, где офтальмологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, хориоидальной неоваскуляризации, макулярной дегенерации, дегенерации сетчатки, макулярного отека, отека сетчатки и отека желтого пятна.

Аспект 56. Использование рекомбинантной экспрессионной конструкции согласно аспекту 21 или рекомбинантного вируса согласно аспекту 50 для терапевтических применений.

Аспект 57. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения офтальмологического заболевания, содержащая рекомбинантный аденоассоциированный вирус и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где рекомбинантный аденоассоциированный вирус содержит (а) капсидный белок AAV типа 8 и (b) рекомбинантную экспрессионную конструкцию для экспрессии трансгена, включающую трансген, содержащий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 и контрольный элемент, функционально связанный с контролем трансгена и содержащий (1) энхансерную последовательность цитомегаловируса (CMV), указанную в SEQ ID NO: 4, (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8, (3) последовательность экзона 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15, (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10, (5) интронный фрагмент EF-1 α , в котором смежные или несмежные нуклеотиды в положениях с 1 по 829 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, усечены, а нуклеотиды в положениях 830-924 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, по существу присутствуют, и (6) последовательность EF-1 α экзона 2 (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

Техническое решение

Настоящее изобретение в целом направлено на нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности (также упоминаемые здесь как «интроны») и использование таких последовательностей для экспрессии трансгена. Как описано в настоящей заявке, заявитель установил, что определенные фрагменты интронной последовательности EF-1 α проявляют превосходную способность к увеличению экспрессии трансгена. Как продемонстрировано в настоящей заявке, в некоторых аспектах эти фрагменты интрона EF-1 α являются сопоставимыми или превосходят полноразмерный интрон EF-1 α в увеличении экспрессии трансгена. Дополнительные аспекты настоящего раскрытия представлены во всей настоящей заявке.

Чтобы облегчить понимание изобретения, раскрытого в настоящей заявке, определен ряд терминов и выражений. Дополнительные определения изложены во всем

подробном описании.

I. Определения

Во всем настоящем изобретении термины единственного числа относятся к одному или нескольким объектам; например, «полипептид» означает один или несколько полипептидов. Как таковые, термины единственного числа, «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Кроме того, термин «и/или», используемый в настоящей заявке, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», здесь предназначен для включения «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

Термин «по меньшей мере», предшествующий числу или серии чисел, следует понимать как включающий число, смежное с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые логически могли бы быть включены, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотид обладают указанным свойством. Когда «по меньшей мере» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньшей мере» может изменять каждое из чисел в серии или диапазоне. «По меньшей мере» также не ограничивается целыми числами (например, «по меньшей мере 5%» включает 5,0%, 5,1%, 5,18% без учета количества значимых цифр).

Понятно, что везде, где аспекты описаны в настоящей заявке с использованием формулировки «содержащий», в противном случае также предоставляются аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное раскрытие. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают для специалистов в данной области техники общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в их принятой международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в аминокислотной ориентации. Заголовки, представленные в настоящей заявке, не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут быть получены путем ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определяются ссылкой на описание в целом.

Термин «примерно» используется здесь для обозначения приблизительно, около, или в области. Когда термин «примерно» используется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В общем, термин «примерно» может изменять числовое значение выше или ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

Используемый в настоящей заявке термин «аденоассоциированный вирус» (AAV) включает, без ограничения указанными, AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAVrh.74, змеиный AAV, птичий AAV, бычий AAV, собачий AAV, лошадиный AAV, овечий AAV, козий AAV, креветочный AAV, серотипы и клады AAV, раскрытые Gao et al. (J. Virol. 78:6381 (2004)) и Gao et al. (J. Virol. 78:6381 (2004)) и Moris et al. (Virol. 33:375 (2004)), и любой другой AAV, известный в настоящее время или обнаруженный позже. См., например, FIELDS et al. VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). В некоторых аспектах «AAV» включает производное от известного AAV. В некоторых аспектах «AAV» включает модифицированный или искусственный AAV.

Термины «применение», «введение» и их грамматические варианты относятся к введению композиции (например, полинуклеотида, содержащего трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке) субъекту фармацевтически приемлемым путем. Введение композиции субъекту осуществляют любым подходящим путем, включая внутриопухолевый, пероральный, легочный, интраназальный, парентеральный (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, интраперитонеально или подкожно), ректальный, внутрилимфатический, интратекальный, периокулярный или местный. Применение включает само-применение и применение другим лицом. Подходящий способ применения позволяет композиции или агенту выполнять свою предназначенную функцию. Например, если подходящим путем является внутривенное введение, композицию применяют путем введения композиции

или агента в вену субъекта.

Используемая в настоящей заявке конструкция «СЕЕ» включает энхансер CMV, промотор EF-1 α и интронный фрагмент EF-1 α . Конструкция «СЕ» включает энхансер CMV и промотор EF-1 α , но не содержит никакого интронного фрагмента (например, никакого интронного фрагмента EF-1 α). Конструкция «САЕ» включает энхансер CMV, промотор куриного β -актина и интронный фрагмент EF-1 α . Используемая в настоящей заявке конструкция «САГ» включает энхансер CMV, промотор куриного β -актина и гибридный интронный фрагмент куриного β -актина/кроличьего β -глобина. Конструкция «СА» включает энхансер CMV и промотор куриного β -актина, но не содержит никакого интронного фрагмента (например, никакого интронного фрагмента EF-1 α). См. Фигуры 4А, 5А и 5С.

Используемый в настоящей заявке термин «консервативный» относится к нуклеотидам или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, соответственно, которые являются остатками, остающимися неизменными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются относительно консервативными, - это те, которые сохраняются среди большего количества родственных последовательностей, чем нуклеотиды или аминокислоты, появляющиеся в других последовательностях.

В некоторых аспектах две или более последовательности считаются «полностью сохраненными» или «идентичными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности называются «высококонсервативными», если они по меньшей мере на 70% идентичны, по меньшей мере на 80% идентичны, по меньшей мере на 90% идентичны или по меньшей мере на 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности называются «высококонсервативными», если они примерно на 70% идентичны, примерно на 80% идентичны, примерно на 90% идентичны, примерно на 95%, примерно на 98% или примерно на 99% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности называются «консервативными», если они по меньшей мере на 30% идентичны, по меньшей мере на 40% идентичны, по меньшей мере на 50% идентичны, по меньшей мере на 60% идентичны, по меньшей мере на 70% идентичны, по меньшей мере на 80% идентичны, по меньшей мере на 90% идентичны, или по меньшей мере на 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности считаются «консервативными», если они примерно на 30% идентичны, примерно на 40% идентичны, примерно на 50% идентичны, примерно на 60% идентичны, примерно на 70%

идентичны, примерно на 80% идентичны, примерно на 90% идентичны, примерно на 95% идентичны, примерно на 98% идентичны, или примерно на 99% идентичны друг другу. Сохранение последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или свойству.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к двум или более олигомерам (т.е. каждый из которых содержит последовательность нуклеиновых оснований) или к олигомеру и гену-мишени, которые связаны друг с другом правилами спаривания оснований Уотсона-Крика. Например, последовательность нуклеотидного основания «Т-Г-А (5'→3')» комплементарна последовательности нуклеотидного основания «А-С-Т (3'→5')». Комплементарность может быть «частичной», при которой не все нуклеотидные основания данной последовательности нуклеотидных оснований соответствуют другой последовательности нуклеотидных оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Например, в некоторых аспектах комплементарность между данной последовательностью нуклеиновых оснований и другой последовательностью нуклеиновых оснований может составлять примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. Соответственно, в определенных аспектах термин «комплементарный» относится по меньшей мере примерно к 80%, по меньшей мере примерно к 85%, по меньшей мере примерно к 90%, по меньшей мере примерно к 91%, по меньшей мере примерно к 92%, по меньшей мере примерно к 93%, по меньшей мере примерно к 94%, по меньшей мере примерно к 95%, по меньшей мере примерно к 96%, по меньшей мере примерно к 97%, по меньшей мере примерно к 98% или по меньшей мере примерно к 99% совпадения или комплементарности с целевой нуклеиновокислотной последовательностью. Или может быть «полная» или «совершенная» (100%) комплементарность между данной последовательностью нуклеотидов и другой последовательностью нуклеотидов, чтобы продолжить пример. В некоторых аспектах степень комплементарности между последовательностями нуклеиновых оснований оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между последовательностями.

Используемое в настоящей заявке выражение «смежные или несмежные нуклеотиды усечены» означает, что оно включает смежные или несмежные нуклеотидные последовательности, оставшиеся в результате усечения по сравнению с последовательностью дикого типа (или исходной), но не включает какой-либо процесс усечения. Термин может включать «усечение смежных нуклеотидов», «усечение несмежных нуклеотидов, остающихся не усеченными между усеченными нуклеотидами» и «вставка различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или

несмежных нуклеотидов». Например, в случае нуклеотидной последовательности «А-Т-Г-С-С-Г-Т-С», усечение смежных нуклеотидов включает усечение одного или нескольких смежных нуклеотидов, таких как «А-_-_-С-Г-Т-С», усечение несмежных нуклеотидов означает, что один или несколько нуклеотидов остаются не усеченными между усеченными нуклеотидами, такими как «А-_-Г-_-С-Г-Т-_-», и вставка различных типов нуклеотидов в положения усеченных смежных или несмежных нуклеотидов означает, что один или несколько нуклеотидов, отличных от исходных, вставлены в положения усеченных нуклеотидов, например, «А-А-Г-_-С-Г-Т-Г».

Термин «расположенная ниже» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена на 3' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В определенных аспектах расположенные ниже нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за начальной точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже от сайта начала транскрипции.

Используемый в настоящей заявке термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях может функционировать независимо от их ориентации относительно другой контрольной последовательности. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами.

Термины «вспомогательное вещество» и «носитель» используются взаимозаменяемо и относятся к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения соединения, например, полинуклеотида, содержащего трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке.

Термин «экзон» относится к определенному участку нуклеиновой кислоты, который кодирует белок, или к нуклеиновокислотной последовательности, которая представлена в зрелой форме молекулы РНК после того, как любые части предварительно подвергнутой процессингу (или предшественника) РНК были удалены путем сплайсинга. Зрелая молекула РНК может быть матричной РНК (мРНК) или функциональной формой не кодирующей РНК, такой как рРНК или тРНК.

Термин «экспрессия», используемый в настоящей заявке, относится к процессу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид. Она включает, без ограничения указанными, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК) и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия производит

«генный продукт». Используемый в настоящей заявке генный продукт может быть, например, нуклеиновой кислотой, такой как РНК, продуцируемая транскрипцией гена. Используемый в настоящей заявке генный продукт может быть либо нуклеиновой кислотой, либо полипептидом, который транслируется из транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящей заявке, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, фосфорилированием, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

Используемый в настоящей заявке термин «идентичность» относится к общему сохранению мономера между полимерными молекулами, например, между молекулами полинуклеотидов. Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных уточнений, например, «полинуклеотид А идентичен полинуклеотиду В», подразумевает, что полинуклеотидные последовательности на 100% идентичны (100% идентичность последовательности). Описание двух последовательностей как, например, «идентичных на 70%» эквивалентно описанию их как имеющих, например, «идентичность последовательности на 70%».

Вычисление процентной идентичности двух полипептидных или полинуклеотидных последовательностей, например, может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одной или обеих из первой и второй полипептидных или полинуклеотидных последовательностей для оптимального выравнивания, а неидентичные последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения). В определенных аспектах длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% длины из эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих аминокислотных положениях или основания в случае полинуклеотидов.

Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, с учетом количества гэпов и длины каждого промежутка, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма.

Подходящее программное обеспечение, которое можно использовать для выравнивания различных последовательностей (например, полинуклеотидных последовательностей), доступно из различных источников. Одной из подходящих программ для определения процентной идентичности последовательности является bl2seq, часть пакета программ BLAST, доступного с веб-сайта BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq выполняет сравнение между двумя последовательностями, используя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, в то время как BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, входящие в набор биоинформационных программ EMBOSS и также доступные в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

Выравнивание последовательностей может быть проведено с использованием методов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

Различные области в пределах одной полинуклеотидной или полипептидной последовательности-мишени, которая совпадает с полинуклеотидной или полипептидной эталонной последовательностью, могут иметь свою собственную процентную идентичность последовательности. Следует отметить, что значение идентичности последовательности в процентах округлено до ближайшей десятой. Например, 80,11; 80,12; 80,13 и 80,14 округляют в меньшую сторону до 80,1, в то время как 80,15; 80,16; 80,17; 80,18 и 80,19 округляют до 80,2. Также отмечается, что значение длины всегда будет целым числом.

В определенных аспектах процент идентичности (%ID) первой аминокислотной последовательности (или нуклеиновокислотной последовательности) к второй аминокислотной последовательности (или нуклеиновокислотной последовательности) вычисляют как $\%ID = 100 \times (Y/Z)$, где Y - количество аминокислотных остатков (или нуклеотидных оснований), оцениваемое как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании с помощью визуального контроля или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z - общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой

последовательности больше, чем у второй последовательности, процент идентичности первой последовательности с второй последовательностью будет выше, чем процент идентичности второй последовательности с первой последовательностью.

Специалист в данной области техники оценит, что генерация выравнивания последовательности для вычисления процентной идентичности последовательности не ограничивается попарными сравнениями последовательности с последовательностью, основанными исключительно на данных первичной последовательности. Также следует понимать, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательности с данными из разнородных источников, таких как структурные данные (например, кристаллографические структуры белка), функциональные данные (например, местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для создания множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная по адресу www.tcoffee.org, и альтернативно доступная, например, из EBI. Также следует иметь в виду, что окончательное выравнивание, используемое для вычисления процентной идентичности последовательности, может быть настроено либо автоматически, либо вручную.

Используемый в настоящей заявке термин «интрон» относится к участку ДНК (промежуточным последовательностям) внутри гена, которые не кодируют часть белка, который продуцирует ген, и который подвергнут сплайсингу из мРНК, которая транскрибируется из гена, прежде чем она экспортируется из ядра клетки. «Интронная последовательность» относится к нуклеиновокислотной последовательности интрона. Такие последовательности также упоминаются в настоящей заявке как «нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность». Таким образом, интроны - это те участки последовательностей ДНК, которые транскрибируются вместе с кодирующей последовательностью (экзонами), но удаляются во время образования зрелой мРНК.

Используемый в настоящей заявке термин «интронный фрагмент» относится к фрагменту, полученному из полноразмерной последовательности интрона A EF-1 α (т.е. первого интрона EF-1 α , такого как тот, который указан в SEQ ID NO: 1). Фрагмент предназначен для исключения полноразмерного интрона EF-1 α . В некоторых аспектах «интронный фрагмент» включает минимальное количество нуклеотидов или элементов, требуемых для достижения уровня экспрессии, превышающего тот, который достигается соответствующей конструкцией, в которой отсутствуют все нуклеотиды интрона A EF-1 α . Соответственно, интронный фрагмент по настоящему раскрытию (также упоминаемый в настоящей заявке как «нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность»)

особо не ограничен, если он включает интронный фрагмент EF-1 α и позволяет увеличивать экспрессию трансгена. Как продемонстрировано в настоящей заявке, в некоторых аспектах интронный фрагмент (т.е. нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность) позволяет увеличивать транскрипцию трансгена, приводя к усиленной экспрессии трансгена. Соответственно, в некоторых аспектах интронный фрагмент, описанный в настоящей заявке, может быть нетранслируемым регуляторным элементом.

Используемые в настоящей заявке термины «изолированный», «очищенный», «экстрагированный» и их грамматические варианты взаимозаменяемы и относятся к состоянию препарата необходимой композиции по настоящему раскрытию, например, полинуклеотида, содержащего трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, который подвергся одному или нескольким процессам очистки. В некоторых аспектах, изоляция или очистка, как используется в настоящей заявке, представляет собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) композиции из настоящего раскрытия, например, полинуклеотида, описанного здесь, из образца, содержащего загрязняющие вещества.

В некоторых аспектах изолированная композиция не обладает обнаруживаемой нежелательной активностью или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или количестве, или ниже его. В других аспектах изолированная композиция имеет количество и/или концентрацию необходимой композиции по настоящему раскрытию, на уровне или выше приемлемого количества и/или концентрации и/или активности. В других аспектах выделенная композиция обогащена по сравнению с исходным материалом, из которого получена композиция. Это обогащение может составлять по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, по меньшей мере примерно 99,9%, по меньшей мере примерно 99,99%, по меньшей мере примерно 99,999%, по меньшей мере примерно 99,9999% или более 99,9999% по сравнению с исходным материалом.

В некоторых аспектах изолированные препараты практически не содержат остаточных биологических продуктов. В некоторых аспектах изолированные препараты на 100% свободны, по меньшей мере на 99% свободны, по меньшей мере на 98%

свободны, по меньшей мере на 97% свободны, по меньшей мере на 96% свободны, по меньшей мере на 95% свободны, по меньшей мере на 94% свободны, по меньшей мере на 93% свободны, по меньшей мере примерно на 92% свободны, по меньшей мере примерно на 91% свободны, или по меньшей мере примерно на 90% свободны от любого загрязняющего биологического вещества. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты.

Термин «связанный», используемый в настоящей заявке, относится к первой аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности, соответственно. Первая аминокислотная или полинуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена или сопоставлена со второй аминокислотной или полинуклеотидной последовательностью, или альтернативно, промежуточная последовательность может ковалентно присоединять первую последовательность ко второй последовательности. Термин «связанный» означает не только слияние первой полинуклеотидной последовательности со второй полинуклеотидной последовательностью на 5'-конце или 3'-конце, но также включает вставку всей первой полинуклеотидной последовательности (или второй полинуклеотидной последовательности) в любые два нуклеотида во второй полинуклеотидной последовательности (или первой полинуклеотидной последовательности, соответственно). Первая полинуклеотидная последовательность может быть связана со второй полинуклеотидной последовательностью фосфодиэфирной связью или линкером. Линкером может быть, например, полинуклеотид.

Используемый в настоящей заявке термин «макулярная дегенерация» относится к любому числу расстройств и состояний, при которых желтое пятно дегенерирует или теряет функциональную активность. Дегенерация или потеря функциональной активности могут возникать в результате, например, гибели клеток, снижения клеточной пролиферации, потери нормальной биологической функции или комбинации вышеперечисленного. Дегенерация желтого пятна может приводить и/или проявляться в виде изменений структурной целостности клеток и/или внеклеточного матрикса желтого пятна, изменения нормальной архитектуры клеток и/или внеклеточного матрикса и/или потери функции клеток желтого пятна. Клетки могут быть любым типом клеток, обычно присутствующих в желтом пятне или вблизи него, включая клетки пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторы и/или эндотелиальные клетки капилляров. Возрастная макулярная дегенерация является наиболее распространенной из макулярных

дегенераций, но термин «макулярная дегенерация» не обязательно исключает макулярную дегенерацию у пациентов, которые не являются пожилыми. Неограничивающие примеры макулярных дегенераций включают: возрастную макулярную дегенерацию (влажную или сухую); макулярную дистрофию Беста, дистрофию глазного дна Сорсби, маллатию левентинскую или сотовую дистрофию сетчатки Дойна, болезнь Старгардта (также называемую макулярной дистрофией Старгардта, ювенильной макулярной дегенерацией или желтопятнистой абиотрофией сетчатки) и связанную с отслойкой пигментного эпителия макулярную дегенерацию.

Используемый в настоящей заявке термин «возрастная макулярная дегенерация» (ВМД) относится к ретинопатии, которая обычно поражает пожилых людей и связана с потерей центрального зрения в результате повреждения центральной части (т.е. желтого пятна) сетчатки. ВМД обычно характеризуется прогрессирующим накоплением или агрегацией желтоватых нерастворимых внеклеточных отложений, называемых друзами (накопление внеклеточных белков, таких как бета-амилоид и липиды), в макуле (в основном между пигментным эпителием сетчатки (ПЭС) и подлежащей сосудистой оболочкой). Накопление или агрегация этих отложений внутри желтого пятна может вызвать постепенное ухудшение состояния желтого пятна, что приводит к нарушению центрального зрения. Используемый в настоящей заявке термин «желтое пятно» относится к центральной части сетчатки, которая отвечает за центральное цветовое зрение с высоким разрешением.

Патогенез возрастной макулярной дегенерации недостаточно хорошо установлен, хотя были выдвинуты некоторые теории, включая окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию и воспалительные процессы. Дисбаланс между выработкой поврежденных клеточных компонентов и деградацией приводит к накоплению вредных продуктов, например, внутриклеточного липофусцина и внеклеточной друзы. Начинаясь атрофия определяется участками истончения или депигментации пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), которые предшествуют географической атрофии на ранних стадиях ВМД. На поздних стадиях ВМД атрофия ПЭС (географическая атрофия) и/или развитие новых кровеносных сосудов (неоваскуляризация) приводят к гибели фоторецепторов и потере центрального зрения. При сухой (неэкссудативной) ВМД клеточный детрит, называемый друзой, накапливается между сетчаткой и сосудистой оболочкой, вызывая атрофию и рубцевание сетчатки. При влажной (экссудативной) ВМД, которая является более тяжелой формой ВМД, кровеносные сосуды вырастают из сосудистой оболочки (неоваскуляризация) позади сетчатки, что может привести к утечке экссудата и жидкости, а также вызвать

кровоизлияние.

В зависимости от степени присутствия друз, ВМД можно разделить на три основные стадии: (i) раннюю, (ii) промежуточную и (iii) запущенную или позднюю. Ранняя стадия ВМД характеризуется наличием либо нескольких мелких (например, менее 63 микрон в диаметре) друз, либо нескольких друз среднего размера (например, от 63 до 124 микрон в диаметре). На ранней стадии у пациентов нет явных симптомов, и нет потери зрения. Промежуточная стадия характеризуется наличием множества друз среднего размера, или одной или более крупных (например, более 125 микрон в диаметре) друз. На этой стадии у некоторых пациентов могут возникать размытые пятна в центре зрения. Запущенная или поздняя стадия ВМД характеризуется большими участками повреждения ткани сетчатки, вызывающими центральные слепые пятна и, в конечном итоге, потерю центрального зрения. В зависимости от типа повреждения (например, наличия или отсутствия неоваскуляризации) прогрессирующую или позднюю стадию ВМД можно дополнительно разделить на два подтипа: (i) географическую атрофию (также называемую атрофической ВМД) и (ii) влажную ВМД (также называемую неоваскулярной или экссудативной ВМД).

Существует две основные формы ВМД: (i) сухая ВМД и (ii) влажная ВМД. Если не указано иное, термин «возрастная макулярная дегенерация» включает как сухую ВМД, так и влажную ВМД. Используемый в настоящей заявке термин «возрастная макулярная дегенерация» также включает все типы возрастной макулярной дегенерации, независимо от причины и любых без исключения симптомов возрастной макулярной дегенерации. Неограничивающие примеры симптомов, связанных с макулярной дегенерацией (например, возрастная макулярная дегенерация), включают потерю центрального зрения, искажение, снижение контрастной чувствительности, затуманенное зрение, трудности с адаптацией к низкому уровню освещенности, внезапное начало и быстрое ухудшение симптомов, а также снижение цветового зрения. В некоторых аспектах макулярная дегенерация (например, возрастная макулярная дегенерация) может вызывать отек желтого пятна (т.е. набухание желтого пятна в результате скопления жидкости и белковых отложений на макуле или под ней).

Используемый в настоящей заявке термин «сухая ВМД» (также называемая атрофической возрастной макулярной дегенерацией или неэкссудативной ВМД) относится ко всем формам ВМД, которые не являются влажной (неоваскулярной) ВМД. Это включает ранние и промежуточные формы ВМД, а также запущенную форму сухой ВМД, известную как географическая атрофия. Пациенты с сухой ВМД, как правило, имеют минимальные симптомы на ранних стадиях; потеря зрительной функции

происходит чаще, если заболевание прогрессирует до географической атрофии.

Используемый в настоящей заявке термин «влажная ВМД» (также называемая неоваскулярной возрастной макулярной дегенерацией или экссудативной ВМД) относится к состоянию сетчатки, характеризующемуся наличием неоваскуляризации сетчатки, и является наиболее тяжелой формой ВМД. При влажной ВМД кровеносные сосуды растут из хориокапилляров через дефекты мембраны Бруха, а в некоторых случаях и из подлежащего пигментного эпителия сетчатки (хориоидальная неоваскуляризация или ангиогенез). Образование серозного или геморрагического экссудата, выходящего из этих сосудов, может привести к фиброваскулярному рубцеванию макулярной области с сопутствующей дегенерацией нейросетчатки, отслоению и разрывам пигментного эпителия сетчатки, кровоизлиянию в стекловидное тело и постоянной потере центрального зрения.

Термины «miRNA», «miR» и «микроРНК» используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле микроРНК, обнаруженной у эукариотических организмов, которая участвует в регуляции генов на основе РНК. Этот термин будет использоваться для обозначения одноцепочечной молекулы РНК, подвергнутой процессингу из предшественника. В некоторых аспектах термин «антисмысловые олигомеры» также может быть использован для описания молекул микроРНК настоящего изобретения. Названия микроРНК и ее последовательности, относящиеся к настоящему раскрытию, приведены в настоящей заявке. МикроРНК распознают и связываются с мРНК-мишенями посредством несовершенного спаривания оснований, что приводит к дестабилизации или ингибированию трансляции мРНК-мишени и, таким образом, снижает экспрессию гена-мишени. И наоборот, таргетинг микроРНК с помощью молекул, содержащих сайт связывания микроРНК (обычно молекулу, содержащую последовательность, комплементарную затравочной области микроРНК), позволяет уменьшить или ингибировать индуцированное микроРНК ингибирование трансляции, приводящее к повышающей регуляции гена-мишени.

«Нуклеиновая кислота», «нуклеиновокислотная молекула», «нуклеотидная последовательность», «полинуклеотид» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями. Полинуклеотиды представлены в настоящей заявке в направлении от 5' к 3'. Полинуклеотид по настоящему раскрытию может представлять собой молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК). Нуклеотидные основания обозначены здесь однобуквенным кодом: аденин (А), гуанин (G), тимин (Т), цитозин (С), инозин (I) и урацил (U).

Используемый в настоящей заявке термин «функционально связанный» означает, что последовательности ДНК, подлежащие связыванию, расположены рядом друг с другом для выполнения необходимой функции. Например, промотор функционально связан с кодирующей областью, если промотор помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности (например, транскрипта). Если сохраняется эта функциональная взаимосвязь, промотор не обязательно должен быть смежным с кодирующей областью.

Термины «фармацевтически приемлемый носитель», «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» и их грамматические вариации охватывают любое из средств, одобренных регулирующим органом Федерального правительства США или перечисленных в Фармакопее США для применения на животных, включая людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает нежелательных физиологических эффектов до такой степени, которая запрещает введение композиции субъекту, и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены вспомогательные вещества и носители, которые полезны при приготовлении фармацевтической композиции и, как правило, безопасны, нетоксичны и необходимы.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтическая композиция» относится к одной или нескольким из описанных здесь композиций (например, полинуклеотидов, векторов, клеток и/или рекомбинантных вирусов), смешанных или перемешанных с одним или несколькими другими химическими компонентами, такими как фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества, или суспендированных в них.

Используемые в настоящей заявке термины «промотор» и «промоторная последовательность» являются взаимозаменяемыми и относятся к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. В целом, кодирующая последовательность расположена на 3' к промоторной последовательности. Промоторы могут быть полностью получены из нативного гена или состоять из различных элементов, полученных из различных натуральных промоторов, или даже содержать синтетические сегменты ДНК. Специалистам в данной области техники понятно, что различные промоторы могут направлять экспрессию гена в разных тканях или типах клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на различные экологические или физиологические условия. Промоторы, которые заставляют ген экспрессироваться в большинстве типов клеток, в большинстве случаев обычно называются «конститутивными промоторами». Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в определенном типе клеток, обычно называются

«клеточно-специфическими промоторами» или «тканеспецифическими промоторами». Промоторы, которые вызывают экспрессию гена на определенной стадии развития или клеточной дифференцировки, обычно называются «специфичными для развития промоторами» или «специфичными для клеточной дифференцировки промоторами». Промоторы, которые индуцируются и вызывают экспрессию гена после воздействия или обработки клетки агентом, биологической молекулой, химическим веществом, лигандом, светом или подобным, индуцирующим промотор, обычно называют «индуцибельными промоторами» или «регулируемыми промоторами». Далее признается, что, поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей не были полностью определены, фрагменты ДНК разной длины могут обладать идентичной промоторной активностью.

Промоторная последовательность обычно ограничена на своем 3'-конце сайтом инициации транскрипции и распространяется вверх (в направлении 5') для включения минимального количества оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на уровнях, превышающих фоновые. Внутри промоторной последовательности будет находиться сайт инициации транскрипции (удобно определяемый, например, путем сопоставления с нуклеазой S1), а также домены, связывающие белки (консенсусные последовательности), ответственные за связывание РНК-полимеразы. В некоторых аспектах промотор, который может быть использован с настоящим изобретением, включает тканеспецифичный промотор.

Используемый в настоящей заявке термин «регуляторная область гена» или «регуляторная область» относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5' некодирующие последовательности), внутри или ниже (3' некодирующие последовательности) кодирующей области, и влияющим на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей области кодирования. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов или структуры типа «стебель-петля». Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут расположены на 3' к кодирующей последовательности.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид (например, содержащий трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) может включать промотор и/или другие элементы контроля экспрессии (например, транскрипции), функционально связанные с одной или несколькими кодирующими

областями. В функциональной ассоциации кодирующая область для генного продукта ассоциируется с одной или несколькими регуляторными областями таким образом, чтобы поместить экспрессию генного продукта под влияние или контроль регуляторной области (областей). Например, кодирующая область и промотор «функционально ассоциированы», если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не препятствует способности промотора направлять экспрессию генного продукта или вмешиваться в способность ДНК-матрицы транскрибироваться. Другие элементы контроля экспрессии, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующей областью для направления экспрессии генного продукта.

Используемые в настоящей заявке термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и «хозяин» и их варианты являются взаимозаменяемыми и относятся к любому млекопитающему субъекту, у которого применяют любую из описанных здесь композиций (например, полинуклеотиды, рекомбинантные экспрессионные конструкции, клетки, фармацевтические композиции или рекомбинантные вирусы). Неограничивающие примеры включают людей, домашних животных (например, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (например, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т.п.), для которых требуется диагностика, обработка или лечение, особенно людей. Способы, описанные в настоящей заявке, применимы как для терапии человека, так и для ветеринарных приложений.

Как используется в настоящей заявке, фраза «субъект, нуждающийся в этом» включает субъектов, таких как представители млекопитающих, для которых может принести пользу введение композиции, описанной здесь.

Используемый в настоящей заявке термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество реагента или фармацевтического соединения, содержащего композицию по настоящему изобретению (например, полинуклеотид, содержащий трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), которое является достаточным для получения необходимого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического эффекта у субъекта, нуждающегося в этом. Терапевтически эффективное количество может быть «профилактически эффективным количеством», поскольку профилактика может рассматриваться как терапия.

Используемый в настоящей заявке термин «трансген» относится по меньшей мере

к одному полинуклеотиду или полинуклеотидной области, кодируемой в рекомбинантной экспрессионной конструкции или в продукте экспрессии полинуклеотида или полинуклеотидной области, к полинуклеотиду, кодирующему полипептид или мульти-полипептид, или к модулирующей или регулирующей нуклеиновой кислоте. В некоторых аспектах трансген может быть гетерологичным для клетки (т.е. не экспрессироваться естественным образом в клетке), в которую он введен (или трансдуцирован).

Термины «лечить», «лечение» или «излечение», используемые в настоящей заявке, относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или состояния; к сокращению продолжительности течения заболевания; к улучшению или устранению одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием; к оказанию благотворного воздействия на субъекта с болезнью или состоянием, не обязательно приводящему к излечению болезни или состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или состояния, или их симптомов.

Термин «расположенный выше» относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена на 5' относительно эталонной нуклеотидной последовательности.

Используемый в настоящей заявке термин «вектор» или «конструкция» относится к любому носителю, в который может быть вставлена нуклеиновая кислота или ген, такому как носители доставки, в которые может быть вставлена нуклеиновокислотная последовательность для введения в клетку, где она может быть реплицирована. Нуклеиновокислотная последовательность, которая может быть вставлена в вектор, может быть экзогенной или гетерологичной. Нуклеиновокислотная последовательность может быть трансгеном. Примеры конструкций включают, без ограничения указанными, плазмиды, космиды и вирусы (например, AAV). Специалисты в данной области техники могут сконструировать вектор или конструкцию с помощью стандартных рекомбинантных методик (Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; и Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994, и т.д.). Используемый в настоящей заявке термин «экспрессионный вектор» или «экспрессионная конструкция» относится к вектору или конструкции, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере часть генного продукта, подлежащего транскрипции. В некоторых случаях молекулы РНК затем транслируют в белок, полипептид или пептидный комплекс. Экспрессионные конструкции могут включать различные контрольные элементы. В дополнение к регуляторным последовательностям, которые управляют транскрипцией и трансляцией, векторы и экспрессионные векторы могут включать нуклеотидные последовательности, которые также выполняют другие функции.

Векторы могут быть сконструированы для кодирования селективируемых маркеров или репортеров, которые обеспечивают отбор или идентификацию клеток, включивших вектор. Экспрессия селективируемых маркеров или репортеров позволяет идентифицировать и/или отбирать клетки-хозяева, которые включают и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся в векторе. Примеры селективируемых маркерных генов, известных и используемых в данной области техники, включают гены, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафосу, сульфаниламиду и т.п., и гены, которые используются в качестве фенотипических маркеров, т.е. регуляторные гены антоцианинов, ген изопентанилтрансферазы и т.п. Примеры репортеров, известных и используемых в данной области техники, включают: люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), β -галактозидазу (lacZ), β -глюкуронидазу (Gus) и тому подобное. Селективируемые маркеры также могут рассматриваться как репортеры.

II. Полинуклеотиды

II.A. Нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности

Настоящее изобретение направлено на полинуклеотиды, содержащие нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, которая способна увеличивать экспрессию трансгена при трансляции. В частности, здесь представлены интронные последовательности фактора элонгации-1 альфа (EF-1 α), которые являются более короткими, чем полноразмерный интрон EF-1 α .

Фактор элонгации-1 альфа (EF-1 α) представляет собой ген, расположенный на хромосоме 6 (нуклеотиды 73,489,308-73,525,587 регистрационного номера GenBank NC_000006.12; минус ориентация нити). Ген EF-1 α включает 8 экзонов и 7 интронов и кодирует белок эукариотического фактора элонгации 1A (также известный как eEF1A1 и eEF1A), который играет важную роль в трансляции мРНК (например, переносит аминокислот-тРНК в сайт А рибосомы в виде тройного комплекса eEF1A1-GTP-aa-тРНК). Scaggiante et al., Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 19(4): 256-265 (Mar. 2015). Нуклеотидная последовательность полноразмерного интрона EF-1 α приведена в SEQ ID NO: 1 (длиной 924 нуклеотида). Как описано в настоящей заявке, нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности из настоящего изобретения (т.е. последовательности фрагментов интрона EF-1 α) обеспечивают явные преимущества по сравнению с полноразмерным интроном EF-1 α (или любым другим интроном, известным в данной области техники). Например, в некоторых аспектах нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности, описанные в настоящей заявке, могут

увеличивать экспрессию трансгена в большей степени, чем полноразмерный интрон EF-1 α . Кроме того, поскольку нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности по настоящему изобретению короче, чем полноразмерные аналоги, в некоторых аспектах их можно использовать в комбинации с более крупными трансгенами. Например, капсид AAV (такой, как описано в настоящей заявке) может вмещать максимум примерно 4,7 т.п. нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых аспектах с описанными здесь фрагментами интрона EF-1 α (т.е. нетранслируемыми нуклеиновокислотными последовательностями) возможно включение более крупных трансгенов и/или дополнительных цис-элементов для значительно улучшенной экспрессии генов.

В некоторых аспектах описанная в настоящей заявке нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность (т.е. интронный фрагмент EF-1 α) содержит нуклеотиды в положениях 874-924 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит по существу из нуклеотидов 874-924 SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидов 874-924 SEQ ID NO: 1. Такой интронный фрагмент EF-1 α также упоминается здесь как «фрагмент Т3.2» и указан в SEQ ID NO: 57. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 874-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах описанная в настоящей заявке нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность (т.е. интронный фрагмент EF-1 α) содержит нуклеотиды 852-924 из SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность по настоящему изобретению состоит по существу из нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидов 852-924 SEQ ID NO: 1. Такой интронный фрагмент EF-1 α также упоминается в настоящей заявке как «фрагмент Т3.1.2» и указан в SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере

примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 852-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах описанная в настоящей заявке нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность (т.е. интронный фрагмент EF-1 α) содержит нуклеотиды 830-924 из SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность по настоящему изобретению состоит по существу из нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1. Такой интронный фрагмент EF-1 α также упоминается здесь как «фрагмент ТЗ.1.1» и указан в SEQ ID NO: 2. В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 830-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

Как очевидно из настоящего раскрытия, в дополнение к вышеописанным нуклеотидам (т.е. положениям 874-924, 852-924 и 830-924 из SEQ ID NO: 1 - т.е. SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 2, соответственно), в некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность по настоящему раскрытию может содержать дополнительные смежные или несмежные нуклеотиды интронной последовательности EF-1 α в 5'-области, такие как те, которые указаны в SEQ ID NO: 1. Например, в некоторых аспектах дополнительные смежные или несмежные нуклеотиды в 5'-области могут быть добавлены в любом месте выше от нуклеотидов 874-924, 852-924 или 830-924 из SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах дополнительные смежные или несмежные нуклеотиды в 5'-области получены из полноразмерной последовательности интрона EF-1 α , т.е. SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах дополнительные смежные или несмежные нуклеотиды в 5'-области и/или 3'-области получены из любых последовательностей, гетерологичных полноразмерной последовательности интрона EF-1 α , т.е. SEQ ID NO: 1.

Соответственно, в некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких дополнительных

смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-873 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (приводя к интронному фрагменту EF-1 α , содержащему, состоящему по существу, или состоящему из нуклеотидов 874-924 из SEQ ID NO: 1; «Т3.2 фрагменту»; SEQ ID NO: 57).

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-870 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 871-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 58). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-870 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-870 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-870 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-870 из SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-860 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 861-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 59). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-860 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-860 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-860 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-860 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных

нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-851 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 60). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-851 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-851 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-851 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-851 в SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-850 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 851-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 61). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-850 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-850 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-850 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-850 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-829 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 2). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных

нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-829 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-829 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-829 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-829 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-820 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 821-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 63). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-820 из SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-820 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-820 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-820 из SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-810 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 811-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 64). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-810 из SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-810 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-810 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько

различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-810 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-807 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 808-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 65). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-807 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-807 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-807 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-807 в SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-800 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 801-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 66). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-800 из SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-800. из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-800 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-800 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных

нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-750 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 751-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 67). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-750 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-750 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-750 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-750 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-720 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 721-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 68). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-720 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-720 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-720 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-720 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-700 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 701-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 69). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных

нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-700 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-700 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-700 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-700 последовательности ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-650 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 651-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 70). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, происходящих из нуклеотидных положений 1-650 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-650 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-650 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-650 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-600 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 601-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 71). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-600 из SEQ ID NO: 1, при условии, что один или более смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных позиций 1-600 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-600 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько

различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-600 из SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-569 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 570-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 72). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-569 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-569 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-569 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-569 из SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-550 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 551-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 73). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-550 в SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-550 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-550 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-550 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная в настоящей заявке, не содержит никаких смежных или несмежных

нуклеотидов, полученных из нуклеотидов в положениях 1-500 в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 (с получением интронного фрагмента EF-1 α , содержащего, состоящего по существу, или состоящего из нуклеотидов 501-924 из SEQ ID NO: 1; т.е. SEQ ID NO: 74). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, полученных из нуклеотидных положений 1-500 из SEQ ID NO: 1, при условии, что один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов не являются всей длиной нуклеотидных положений 1-500 из SEQ ID NO: 1 (например, короче, чем нуклеотиды 1-500 из SEQ ID NO: 1). В некоторых аспектах такая нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность может содержать один или несколько различных типов нуклеотидов (т.е. не происходящих из нуклеотидных положений 1-500 из SEQ ID NO: 1) на 5'-конце и/или 3'-конце нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах описанная нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности (i) с нуклеотидами 871-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 58), (ii) с нуклеотидами 861-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 59), (iii) с нуклеотидами 852-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 60), (iv) с нуклеотидами 851-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 61), (v) с нуклеотидами 830-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 2), (vi) с нуклеотидами 821-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 63), (vii) с нуклеотидами 811-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 64), (viii) с нуклеотидами 808-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 65), (ix) с нуклеотидами 801-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 66), (x) с нуклеотидами 751-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 67), (xi) с нуклеотидами 721-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 68), (xii) с нуклеотидами 701-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 69), (xiii) с нуклеотидами 651-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 70), (xiv) с нуклеотидами 601-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 71), (xv) с нуклеотидами 570-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 72), (xvi) с нуклеотидами 551-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 73), или (xvii) с нуклеотидами 501-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 74).

В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по

меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 651-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 70). В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 601-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 71). В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 570-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 72). В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 551-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 73). В некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 501-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 74).

Как очевидно из вышеупомянутого раскрытия, в некоторых аспектах полинуклеотид, содержащий описанную здесь нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержит по меньшей мере примерно один, по меньшей мере примерно два, по меньшей мере примерно три, по меньшей мере примерно четыре, по меньшей мере примерно пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере

примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 5'-конце («5'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности. В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит по меньшей мере примерно один, по меньшей мере примерно два, по меньшей мере примерно три, по меньшей мере примерно четыре, по меньшей мере примерно пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 3'-конце («3'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности. В некоторых аспектах полинуклеотид, содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержит по меньшей мере примерно один, по меньшей мере примерно два, по меньшей мере примерно три, по меньшей мере примерно четыре, по меньшей мере примерно пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов как в 5'-области, так и в 3'-области нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, соответствующих положениям 1-873 в SEQ ID NO: 1 в 5'-области нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

II.B. Трансген

В некоторых аспектах полинуклеотид, включающий описанную в настоящей заявке нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, дополнительно содержит трансген. Соответственно, в некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, содержит трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит, состоит по существу, или состоит из нуклеотидов 874-924 из SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 57). В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, содержит трансген и нетранслируемую

нуклеиновокислотную последовательность, причем нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит, состоит по существу, или состоит из нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, содержит трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит, состоит по существу, или состоит из нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1, но не содержит SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 2).

Трансгены, полезные для настоящего изобретения, особо не ограничены при условии, если трансген может быть переведен в полипептид при трансдукции в клетку. Соответственно, любые подходящие трансгены, представляющие интерес, могут быть использованы с нетранслируемыми нуклеиновокислотными последовательностями из настоящего раскрытия. В некоторых аспектах трансген кодирует полипептид (или любой его вариант), гибридный белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу на основе РНК (например, микроРНК, кшРНК, рибозим, миРНК) или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах трансген кодирует белок, который полезен для лечения заболевания или расстройства, такого как описанные в настоящей заявке. В некоторых аспектах трансген кодирует терапевтический пептид для конкретного заболевания с целью устойчивой экспрессии в организме субъекта или пациента. В некоторых аспектах трансген включает нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах трансген кодирует гибридный белок, который является ингибитором фактора роста эндотелия сосудов («VEGF»). В некоторых аспектах ингибитор VEGF включает афлиберцепт (EYLEA® и ZALTRAP®).

II.C. Контрольный элемент

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид дополнительно содержит контрольный элемент. Соответственно, в некоторых аспектах полинуклеотид содержит (1) контрольный элемент, (2) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке, и (3) трансген.

Используемый в настоящей заявке термин «контрольный элемент» относится к нуклеиновокислотной последовательности, которая регулирует (например, увеличивает

или уменьшает) экспрессию функционально связанной нуклеиновой кислоты. Контрольные элементы, полезные для настоящего раскрытия, включают энхансер (например, энхансер CMV), промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α или промотор β -актина), экзон (например, экзон 1 или экзон 2), сплайсинговую донорную последовательность, рецепторные последовательности или их комбинации. В некоторых аспектах контрольный элемент может включать последовательность для терминации транскрипции (например, поли A), последовательность для стабильной экспрессии трансгена (например, последовательность WPRE), последовательность для снижения трансген-специфического иммунитета (например, последовательность-мишень микроРНК) или их комбинации.

II.C.1. Энхансер

В некоторых аспектах контрольный элемент является энхансером. Соответственно, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (в произвольном порядке) (1) энхансер, (2) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность и (3) трансген. В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер, (2) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, и (3) трансген.

Любые подходящие энхансеры, известные в данной области техники, могут быть использованы с настоящим раскрытием. Неограничивающие примеры подходящих энхансеров включают энхансер цитомегаловируса (CMV), ранний энхансер SV40, энхансер аденовируса 5 E1A, регуляторную область HBV энхансера-1 (Eh-1), длинную контрольную область HPV-16 или -18 E6/7 (LCR), длинный терминальный повтор HIV-1 (LTR) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах энхансер представляет собой энхансер цитомегаловируса (CMV). В некоторых аспектах энхансер CMV содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых аспектах энхансер цитомегаловируса (CMV) включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4.

II.C.2. Промотор

В некоторых аспектах контрольный элемент является промотором. Соответственно, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (в произвольном порядке) (1) промотор, (2) нетранслируемую

нуклеиновокислотную последовательность, и (3) трансген. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) промотор, (2) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, и (3) трансген. В некоторых аспектах контрольный элемент содержит как энхансер, так и промотор. В таких аспектах полинуклеотид может содержать (в произвольном порядке) (1) энхансер, (2) промотор, (3) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, и (4) трансген. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер, (2) промотор, (3) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, и (4) трансген. В настоящем изобретении могут быть использованы любые подходящие промоторы, известные в данной области техники.

В некоторых аспектах промотор включает промотор цитомегаловируса (CMV), промотор EF-1 α , промотор β -актина, промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), промотор белка теплового шока (HSP70) массой 70 кДа, промотор белка, регулируемого глюкозой (GRP78), массой 78 кДа, промотор эукариотического фактора инициации-4A (eIF4A), промотор альфа-1-антитрипсина (AAT), промотор транстретина (TTR), промотор глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), ранний промотор вируса вакуолизации обезьян 40 (SV40), промотор синапсина I (SYN1), промотор рецепторных киназ, связанных с G-белком (GRK), промотор родопсина (Rho) или их комбинации.

В некоторых аспектах промотором, полезным для настоящего раскрытия, является промотор CMV. Соответственно, в некоторых аспектах полинуклеотид содержит (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор CMV, (3) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность и (4) трансген. В некоторых аспектах промотор CMV содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или 6. В некоторых аспектах промотор CMV включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 или 6.

В некоторых аспектах промотор, который может быть использован с настоящим раскрытием, является промотором EF-1 α . В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор EF-1 α , (3) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность и (4) трансген. В некоторых аспектах промотор EF-1 α содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно

70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах промотор EF-1 α включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых аспектах промотор представляет собой промотор β -актина. Следовательно, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор β -актина, (3) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность и (4) трансген. В некоторых аспектах промотор β -актина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах промотор β -актина представляет собой куриный промотор β -актина, такой как указан в SEQ ID NO: 8.

Как показано в настоящей заявке (см. Фиг.4A), в некоторых аспектах описанный здесь полинуклеотид (например, содержащий трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) может содержать множество промоторов. Например, в некоторых аспектах полинуклеотид содержит комбинацию промотора CMV, промотора EF-1 α и/или промотора β -актина. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит как промотор CMV, так и промотор EF-1 α . В таких аспектах промотор CMV может быть частью полноразмерного промотора CMV, такого как последовательность, указанная в SEQ ID NO: 5 (т.е. первые 31 нуклеотидов с 5'-конца SEQ ID NO: 6).

II.C.3. Донорная последовательность сплайсинга

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид (т.е. включающий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) содержит донорную последовательность сплайсинга. Используемый в настоящей заявке термин «донорная последовательность сплайсинга» или «донорный сайт сплайсинга» относится к богатому гуанин-тимином (GT) домену, присутствующему на 5'-конце интрона (например, интрона EF-1 α) (сигнализирует о границе между интронами и экзонами). Как показано в настоящей заявке, такие последовательности могут быть нацелены на получение нетранслируемых нуклеиновокислотных последовательностей из настоящего изобретения. В некоторых аспектах донорная последовательность сплайсинга связана

выше от фрагмента интрона EF-1 α (т.е. нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности). Например, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (в произвольном порядке) (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) донорную последовательность сплайсинга, (4) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность и (5) трансген. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) донорную последовательность сплайсинга, (4) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, и (5) трансген.

В некоторых аспектах донорная последовательность сплайсинга, полезная для настоящего изобретения, имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах донорная последовательность сплайсинга включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10.

II.C.4. Экзонные последовательности

Как показано в настоящей заявке, в некоторых аспектах полинуклеотид по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или несколько экзонных последовательностей. Например, в некоторых аспектах описанный здесь полинуклеотид включает экзонную последовательность 2 (E2) EF-1 α . Соответственно, в некоторых аспектах описанный здесь полинуклеотид содержит следующие признаки (в произвольном порядке): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) донорную последовательность сплайсинга, (4) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (5) последовательность EF-1 α E2, и (6) трансген. В некоторых аспектах такой полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) донорную последовательность сплайсинга, (4) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (5) последовательность EF-1 α E2, и (6) трансген. В некоторых аспектах последовательность EF-1 α E2 имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по

меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах последовательность E2 EF-1 α включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых аспектах одна или несколько экзонных последовательностей, которые могут быть включены в описанный в настоящей заявке полинуклеотид, включают экзонную последовательность 1 цитомегаловируса (CMV), EF-1 α или β -актина (E1). В некоторых аспектах полинуклеотид, описанный здесь, может содержать как последовательность E1, так и E2. Например, в некоторых аспектах полинуклеотид содержит (в произвольном порядке): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , и (7) трансген. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , и (7) трансген.

В некоторых аспектах последовательность E1, которая может быть использована в настоящем изобретении, является последовательностью E1 CMV. В некоторых аспектах последовательность E1 CMV имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах последовательность E1 CMV включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12.

В некоторых аспектах последовательность E1 представляет собой последовательность E1 EF-1 α . В некоторых аспектах последовательность E1 EF-1 α имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по

меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах последовательность E1 EF-1 α включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых аспектах последовательность E1 представляет собой последовательность E1 β -актина. В некоторых аспектах последовательность E1 β -актина имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 или 15. В некоторых аспектах последовательность E1 β -актина включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14 или 15.

II.C.5. Последовательности-мишени микроРНК

Как описано в настоящей заявке, в некоторых аспектах контрольный элемент описанного здесь полинуклеотида содержит одну или несколько последовательностей-мишеней для микроРНК (miRNA), специфичных для иммунных клеток («последовательности-мишени miRNA»). Соответственно, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит следующие признаки (в произвольном порядке): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген, и (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микроРНК. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген и (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микроРНК.

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять, или более последовательностей-мишеней микроРНК. В некоторых аспектах количество

последовательностей-мишеней для микроРНК, которые могут быть включены в описанный здесь полинуклеотид, составляет примерно от двух до шести (например, от 2 до 6). В некоторых аспектах множественные последовательности-мишени микроРНК являются одинаковыми. В некоторых аспектах одна или несколько из множества последовательностей-мишеней микроРНК отличаются.

Как очевидно из настоящего изобретения, включение одной или нескольких последовательностей-мишеней микроРНК может повысить специфичность описанных здесь полинуклеотидов. Например, когда ингибирование трансгена необходимо в определенных типах клеток (например, иммунных клетках), последовательности-мишени микроРНК, специфичные для иммунных клеток, могут быть использованы для ингибирования экспрессии трансгенов в иммунных клетках, в результате чего выработка трансген-специфического иммунитета иммунными клетками может быть заблокирована. Соответственно, используя различные последовательности-мишени микроРНК, можно регулировать экспрессию трансгена в разных клетках/тканях.

Любые подходящие последовательности-мишени микроРНК, известные в данной области техники, могут быть использованы с настоящим изобретением. В некоторых аспектах последовательности-мишени микроРНК специфичны для miR142-3p или miR142-5p. В некоторых аспектах последовательности-мишени микроРНК выбраны из антисмысловых олигонуклеотидов, антагомиров, молекул короткой шпилечной РНК (кшРНК), молекул малой интерферирующей РНК (миРНК), рибозимов, олигонуклеотидов пептидных нуклеиновых кислот (PNA), олигонуклеотидов заблокированных нуклеиновых кислот (LNA) или их комбинаций, которые имеют последовательности, комплементарные полной или частичной последовательности miR142-3p или miR142-5p.

В некоторых аспектах последовательность-мишень микроРНК имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых аспектах последовательность-мишень микроРНК имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах последовательность-мишень микроРНК включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 или

SEQ ID NO: 17.

II.C.6. Последовательности WPRE

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид (т.е. содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) дополнительно содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WPRE). Соответственно, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (в произвольном порядке) (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген, (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микроРНК и (9) последовательность WPRE. В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) E1 последовательность (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген, (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микроРНК и (9) последовательность WPRE.

В некоторых аспектах последовательность WPRE имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах последовательность WPRE включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

II.C.7. Последовательности полиаденилирования

В некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид (т.е. содержащий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) дополнительно включает одну или несколько последовательностей полиаденилирования (pA). Соответственно, в некоторых аспектах полинуклеотид содержит (в произвольном порядке): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например,

последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген, (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микро-РНК, (9) последовательность WPRE и (10) одну или несколько последовательностей рА. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит (от 5' к 3'): (1) энхансер (например, энхансер CMV), (2) промотор (например, промотор CMV, промотор EF-1 α и/или промотор β -актина), (3) последовательность E1 (например, последовательность E1 CMV, последовательность E1 EF-1 α и/или последовательность E1 β -актина), (4) донорную последовательность сплайсинга, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, (6) последовательность E2 EF-1 α , (7) трансген, (8) одну или несколько последовательностей-мишеней микроРНК, (9) последовательность WPRE и (10) одну или несколько последовательностей рА.

В настоящем изобретении могут быть использованы любые подходящие последовательности рА, известные в данной области техники. В некоторых аспектах примеры последовательностей полиаденилирования включают последовательности рА гормона роста человека (hGH), последовательности рА гормона роста крупного рогатого скота (bGH), ранние последовательности рА вируса вакуолизации обезьян 40 (SV40) и поздние последовательности рА SV40, но не ограничиваются ими.

В некоторых аспектах последовательность рА имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах последовательность рА имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых аспектах последовательность рА имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах последовательность рА имеет по меньшей мере примерно 70%, по

меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99%, или примерно 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах последовательности полиаденилирования выбраны из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 19-22.

Как описано выше, в некоторых аспектах описанный в настоящей заявке полинуклеотид содержит (i) трансген (например, SEQ ID NO: 23) и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность CMV, указанную в SEQ ID NO: 4, (2) промоторную последовательность CMV, указанную в SEQ ID NO: 5 или 6, промоторную последовательность EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 7, или промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8, (3) последовательность E1 CMV, указанную в SEQ ID NO: 12, последовательность E1 EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность E1 куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 14 или 15, (4) донорную последовательность сплайсинга, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10, (5) последовательность интронного фрагмента EF-1 α (т.е. нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), содержащую, состоящую по существу, или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 57, и (6) последовательность E2 EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 11.

III. Векторы

В некоторых аспектах в настоящей заявке представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие любой из описанных здесь полинуклеотидов (например, содержащие трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность). Как описано здесь, такие векторы полезны для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах и клетках, предназначенных для терапевтического вмешательства. В некоторых аспектах вектор, пригодный для доставки описанного в настоящей заявке полинуклеотида (например, содержащий трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), включает вирусный вектор. Примеры вирусов, которые могут быть использованы в качестве векторов в настоящем изобретении, включают, без ограничения указанными, ретровирусы, вирусы простого герпеса, лентивирусы, поксвирусы, вирусы осповакцины, рабдовирусы, аденовирусы, хелперзависимые аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), бакуловирус и их комбинации. В некоторых аспектах вектор, который может быть использован с настоящим изобретением, включает невирусный вектор. Неограничивающие примеры

таких векторов включают плазмиду, космиду, искусственную хромосому дрожжей (YAC), бактериофаг и их комбинации.

III. А. Аденоассоциированный вирус (AAV)

В некоторых аспектах полинуклеотиды, описанные в настоящей заявке (например, содержащие трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), доставляют, например, в клетку с использованием AAV. Аденоассоциированные вирусы (AAV) как вирусы с одноцепочечной ДНК являются хелперзависимыми парвовирусами человека. Геном AAV имеет размер примерно 4,7 т.п.н. и состоит из N-конца, кодирующего ген *her*, участвующий в репликации вируса и экспрессии вирусных генов, С-конца, кодирующего ген *cap*, кодирующий капсидный белок вируса, и инвертированного терминального повтора (ITR) со вставками примерно 145 оснований на каждом конце. Инвертированный терминальный повтор 145 п.н. (ITR) имеет Т-образную структуру, служит точкой начала репликации во время репликации вирусного генома и функционирует как первичный упаковочный сигнал. ITR - это всего лишь цис-действующая нуклеотидная последовательность, необходимая для получения рекомбинантной конструкции AAV (rAAV). ITR обладает энхансерной активностью в присутствии белка Rep, но его активность очень слаба в отсутствие белка Rep. Ввиду этих особенностей, когда трансген клонируют в рекомбинантную конструкцию AAV, энхансер, промотор, рА и т.д. должным образом собраны для подготовки экспрессионной конструкции (RJ Samulski и N Muzyczka, *Annu. Rev. Virol.* 2014. 1:427-451). Четыре белка транслируются из гена *her*. Эти белки классифицируются на *her78*, *her68*, *her52* и *her40* по их молекулярной массе и выполняют важные функции в репликации ДНК AAV. Четыре белка транслируются из гена *cap*. Из них белки VP1, VP2 и VP3 являются структурными белками, составляющими частицы AAV, а белок, активирующий сборку (AAP), способствует сборке частиц AAV структурными белками. Некоторые белки и РНК, полученные из вирусов-помощников, таких как аденовирусы или вирусы простого герпеса, необходимы для эффективной репликации аденоассоциированных вирусов (Muzyczka N. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129, 1992).

AAV обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве векторной системы для доставки чужеродной ДНК в клетки. AAV-инфекция клеток в культуре, как правило, является нецитопатической, а естественная инфекция людей и других животных протекает тихо и бессимптомно. Более того, AAV заражает множество различных типов клеток млекопитающих, что дает возможность воздействовать на множество различных тканей *in vivo*. AAV также обладает дополнительными преимуществами, которые делают его особенно привлекательной

вирусной системой для доставки генов, включая стимуляцию иммунного ответа, которая является относительно мягкой по сравнению с другими формами доставки генов, и постоянную экспрессию как в делящихся, так и в покоящихся клетках на основе неинтегрирующей эписомальной векторной ДНК. Кроме того, AAV выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56°C до 65°C в течение нескольких часов), что делает хранение вакцин на основе гAAV в холоде менее критичным.

Типы или серотипы аденоассоциированных вирусов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают AAVrh.10 (AAVrh10), AAV-DJ (AAVDJ), AAV-DJ8 (AAVDJ8), AAV1, AAV2, AAV2G9, AAV3, AAV3a, AAV3b, AAV3-3, AAV4, AAV4-4, AAV5, AAV6, AAV6.1, AAV6.2, AAV6.1.2, AAV7, AAV7.2, AAV8, AAV9, AAV9.11, AAV9.13, AAV9.16, AAV9.24, AAV9.45, AAV9.47, AAV9.61, AAV9.68, AAV9.84, AAV9.9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV16.3, AAV24.1, AAV27.3, AAV42.12, AAV42-1b, AAV42-2, AAV42-3a, AAV42-3b, AAV42-4, AAV42-5a, AAV42-5b, AAV42-6b, AAV42-8, AAV42-10, AAV42-11, AAV42-12, AAV42-13, AAV42-15, AAV42-aa, AAV43-1, AAV43-12, AAV43-20, AAV43-21, AAV43-23, AAV43-25, AAV43-5, AAV44.1, AAV44.2, AAV44.5, AAV223.1, AAV223.2, AAV223.4, AAV223.5, AAV223.6, AAV223.7, AAV1-7/rh.48, AAV1-8/rh.49, AAV2-15/rh.62, AAV2-3/rh.61, AAV2-4/rh.50, AAV2-5/rh.51, AAV3.1/hu.6, AAV3.1/hu.9, AAV3-9/rh.52, AAV3-11/rh.53, AAV4-8/rh.64, AAV4-9/rh.54, AAV4-19/rh.55, AAV5-3/rh.57, AAV5-22/rh.58, AAV7.3/hu.7, AAV16.8/hu.10, AAV16.12/hu.11, AAV29.3/bb.1, AAV29.5/bb.2, AAV106.1/hu.37, AAV114.3/hu.40, AAV127.2/hu.41, AAV127.5/hu.42, AAV128.3/hu.44, AAV130.4/hu.48, AAV145.1/hu.53, AAV145.5/hu.54, AAV145.6/hu.55, AAV161.10/hu.60, AAV161.6/hu.61, AAV33.12/hu.17, AAV33.4/hu.15, AAV33.8/hu.16, AAV52/hu.19, AAV52.1/hu.20, AAV58.2/hu.25, AAVA3.3, AAVA3.4, AAVA3.5, AAVA3.7, AAVC1, AAVC2, AAVC5, AAVF3, AAVF5, AAVH2, AAVrh.72, AAVhu.8, AAVrh.68, AAVrh.70, AAVpi.1, AAVpi.3, AAVpi.2, AAVrh.60, AAVrh.44, AAVrh.65, AAVrh.55, AAVrh.47, AAVrh.69, AAVrh.45, AAVrh.59, AAVhu.12, AAVH6, AAVLK03, AAVH-1/hu.1, AAVH-5/hu.3, AAVLG-10/rh.40, AAVLG-4/rh.38, AAVLG-9/hu.39, AAVN721-8/rh.43, AAVCh.5, AAVCh.5R1, AAVcy.2, AAVcy.3, AAVcy.4, AAVcy.5, AAVCy.5R1, AAVCy.5R2, AAVCy.5R3, AAVCy.5R4, AAVcy.6, AAVhu.1, AAVhu.2, AAVhu.3, AAVhu.4, AAVhu.5, AAVhu.6, AAVhu.7, AAVhu.9, AAVhu.10, AAVhu.11, AAVhu.13, AAVhu.15, AAVhu.16, AAVhu.17, AAVhu.18, AAVhu.20, AAVhu.21, AAVhu.22, AAVhu.23.2, AAVhu.24, AAVhu.25, AAVhu.27, AAVhu.28, AAVhu.29, AAVhu.29R, AAVhu.31, AAVhu.32, AAVhu.34, AAVhu.35, AAVhu.37, AAVhu.39, AAVhu.40, AAVhu.41, AAVhu.42, AAVhu.43, AAVhu.44, AAVhu.44R1,

AAVhu.44R2, AAVhu.44R3, AAVhu.45, AAVhu.46, AAVhu.47, AAVhu.48, AAVhu.48R1, AAVhu.48R2, AAVhu.48R3, AAVhu.49, AAVhu.51, AAVhu.52, AAVhu.54, AAVhu.55, AAVhu.56, AAVhu.57, AAVhu.58, AAVhu.60, AAVhu.61, AAVhu.63, AAVhu.64, AAVhu.66, AAVhu.67, AAVhu.14/9, AAVhu.t19, AAVrh.2, AAVrh.2R, AAVrh.8, AAVrh.8R, AAVrh.12, AAVrh.13, AAVrh.13R, AAVrh.14, AAVrh.17, AAVrh.18, AAVrh.19, AAVrh.20, AAVrh.21, AAVrh.22, AAVrh.23, AAVrh.24, AAVrh.25, AAVrh.31, AAVrh.32, AAVrh.33, AAVrh.34, AAVrh.35, AAVrh.36, AAVrh.37, AAVrh.37R2, AAVrh.38, AAVrh.39, AAVrh.40, AAVrh.46, AAVrh.48, AAVrh.48.1, AAVrh.48.1.2, AAVrh.48.2, AAVrh.49, AAVrh.51, AAVrh.52, AAVrh.53, AAVrh.54, AAVrh.56, AAVrh.57, AAVrh.58, AAVrh.61, AAVrh.64, AAVrh.64R1, AAVrh.64R2, AAVrh.67, AAVrh.73, AAVrh.74, AAVrh8R, AAVrh8R A586R вариант, AAVrh8R R533A вариант, AAV, BAAV, козий AAV, коровий AAV, AAVhE1.1, AAVhEr1.5, AAVhEr1.14, AAVhEr1.8, AAVhEr1.16, AAVhEr1.18, AAVhEr1.35, AAVhEr1.7, AAVhEr1.36, AAVhEr2.29, AAVhEr2.4, AAVhEr2.16, AAVhEr2.16, AAVhEr2.30, AAVhEr2.31, AAVhEr2.36, AAVhEr1.23, AAVhEr3.1, AAV2.5T, AAV-PAEC, AAV-LK01, AAV-LK02, AAV-LK03, AAV-LK04, AAV-LK05, AAV-LK06, AAV-LK07, AAV-LK08, AAV-LK09, AAV-LK10, AAV-LK11, AAV-LK12, AAV-LK13, AAV-LK14, AAV-LK15, AAV-LK16, AAV-LK17, AAV-LK18, AAV-LK19, AAV-PAEC2, AAV-PAEC4, AAV-PAEC6, AAV-PAEC7, AAV-PAEC8, AAV-PAEC11, AAV-PAEC12, AAV-2-pre-miRNA-101, AAV-8h, AAV-8b, AAV-h, AAV-b, AAV SM 10-2, AAV Shuffle 100-1, AAV Shuffle 100-3, AAV Shuffle 100-7, AAV Shuffle 10-2, AAV Shuffle 10-6, AAV Shuffle 10-8, AAV Shuffle 100-2, AAV SM 10-1, AAV SM 10-8, AAV SM 100-3, AAV SM 100-10, B P61 AAV, B P62 AAV, B P63 AAV, AAVrh.50, AAVrh.43, AAVrh.62, AAVrh.48, AAVhu.19, AAVhu.11, AAVhu.53, AAV4-8/rh.64, AAVLG-9/hu.39, AAV54.5/hu.23, AAV54.2/hu.22, AAV54.7/hu.24, AAV54.1/hu.21, AAV54.4R/hu.27, AAV46.2/hu.28, AAV46.6/hu.29, AAV128.1/hu.43, типичный AAV (ttAAV), UPENN AAV 10 и японский AAV 10 серотипа, но не ограничиваются ими.

В некоторых аспектах серотипом аденоассоциированного вируса является AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAVrh10. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV2. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV5. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV8. В некоторых аспектах серотипом AAV является AAV9.

III.B. Векторы, не являющиеся AAV

В настоящей заявке также представлен вектор, не относящийся к AAV, который содержит описанные здесь полинуклеотиды (например, содержащие трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность).

В некоторых аспектах вектором может быть плазмида, космида, искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериофаг или эукариотическая вирусная ДНК. В дополнение к векторам AAV, описанным выше, могут быть использованы другие многочисленные векторные каркасы, известные в данной области техники как полезные для экспрессии белка. Такие векторы включают, без ограничения указанными, аденовирусный вектор, ретровирусный вектор, поксвирусный вектор, бакуловирусный вектор, герпесвирусный вектор, обезьяний вирус 40 (SV40), цитомегаловирус (CMV), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV) и вирус лейкоза мышей Молони. Кроме того, один класс векторов включает элементы ДНК, полученные из вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, бакуловирус, ретровирусы или вирус леса Семлики. Такие векторы могут быть получены промышленным путем или собраны из последовательностей, описанных способами, хорошо известными в данной области техники.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что некоторые раскрытия, относящиеся к векторам AAV, описанным в настоящей заявке, в равной степени применимы к векторам, не относящимся к AAV. Соответственно, если не указано иное, термин «вектор» включает как AAV, так и не-AAV векторы.

IV. Клетки

В некоторых аспектах в настоящей заявке представлены клетки, содержащие любой из описанных здесь полинуклеотидов (например, содержащие нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность). Например, в некоторых аспектах описанные здесь клетки трансдуцируют, трансфицируют или трансформируют рекомбинантной экспрессионной конструкцией, содержащей трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность для экспрессии трансгена.

Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, в некоторых аспектах клетки, описанные в настоящей заявке (например, трансдуцированные полинуклеотидом, содержащим нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), полезны для продукции белка, такого как кодируемый трансгеном, описанным в настоящей заявке (например, ингибитор VEGF). Как описано в настоящей заявке, в некоторых аспектах нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность, описанная здесь (т.е. интронный фрагмент EF-1 α), может усиливать экспрессию белка, кодируемого трансгеном («кодируемого белка») в клетке. Соответственно, в некоторых аспектах клетка, описанная в настоящей заявке (например, трансдуцированная полинуклеотидом, содержащим трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность из настоящего изобретения), обеспечивает повышенную экспрессию кодируемого белка по

сравнению с контрольной клеткой. В некоторых аспектах эталонная клетка трансдуцирована соответствующим полинуклеотидом, но в ней отсутствует нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность.

В некоторых аспектах клетки, описанные в настоящей заявке, могут продуцировать белок, кодируемый трансгеном *in vitro*. В определенных аспектах клетки, описанные в настоящей заявке, могут продуцировать кодируемый белок *in vivo* (например, у субъекта, у которого применяли полинуклеотид, описанный в настоящей заявке). В некоторых аспектах клетки, описанные здесь, могут продуцировать кодируемый белок как *in vitro*, так и *in vivo*.

В некоторых аспектах клетка, которая может быть использована для продукции белка, кодируемого трансгеном (например, *in vitro*), включает клетку-хозяина. Используемый в настоящей заявке термин «клетка-хозяин» предназначен для включения клеток любого организма, которые могут быть трансдуцированы экспрессионной конструкцией (например, вектором) для репликации экспрессионной конструкции или экспрессии гена, кодируемого экспрессионной конструкцией. Такие клетки включают эукариотические клетки и прокариотические клетки. Используемый в настоящей заявке термин «трансдукция» предназначен для включения «трансфекции» и «трансформации». Клетка-хозяин может быть трансдуцирована, трансфицирована или трансформирована с помощью экспрессионной конструкции. Этот процесс означает доставку или введение экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина.

В некоторых аспектах клетка-хозяин является эукариотической клеткой. В некоторых аспектах клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой клетки, трансгенной клетки млекопитающего и растительной клетки. В некоторых аспектах клетка-хозяин является прокариотической клеткой. В некоторых аспектах прокариотическая клетка является бактериальной клеткой.

В некоторых аспектах клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого. В некоторых аспектах клетка насекомого представляет собой Sf9. В некоторых аспектах клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые могут быть использованы с настоящим изобретением, включают клетки HEK293, HeLa, ARPE-19, RPE-1, HepG2, Hep3B, Huh-7, C8D1a, Neuro2A, CHO, MES13, BHK-21, COS7, COP5, A549, MCF-7, HC70, HCC1428, BT-549, PC3, LNCaP, Capan-1, Panc-1, MIA PaCa-2, SW480, HCT166, LoVo, A172, MKN-45, MKN-74, Kato-III, NCI-N87, HT-144, SK-MEL-2, SH-SY5Y, C6, HT-22, PC-12, NIH3T3 и их комбинации.

В некоторых аспектах клетка, которая может быть использована для продукции белка, кодируемого трансеном, описанным в настоящей заявке (например, *in vivo*), включает клетку человека. В некоторых аспектах клетка человека представляет собой клетку субъекта, который должен получить нуклеиновокислотную молекулу, описанную настоящей заявкой. В определенных аспектах человеческая клетка получена от донора (например, здорового человека-субъекта).

V. Фармацевтические композиции

Различные нуклеиновокислотные молекулы, клетки и векторы, раскрытые в настоящей заявке (также упоминаемые здесь как «активные соединения»), могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на такую фармацевтическую композицию.

В некоторых аспектах в настоящей заявке раскрыта фармацевтическая композиция, включающая (a) любой из описанных здесь полинуклеотидов (например, содержащий трансен и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность) и (b) один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В некоторых аспектах в настоящей заявке раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (a) вектор (например, гAAV), как описано здесь, и (b) один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В некоторых аспектах в настоящей заявке раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (a) клетку, как описано здесь, и (b) один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус и фармацевтически приемлемый носитель, где рекомбинантный аденоассоциированный вирус включает (a) капсидный белок AAV типа 8 и (b) полинуклеотид, содержащий (i) трансен, который включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность CMV, указанную в SEQ ID NO: 4; (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8; (3) экзонную последовательность 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15; (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10; (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 57; и (6) экзонную последовательность 2 EF-1 α (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

Фармацевтически приемлемыми носителями, которые могут быть использованы в настоящем раскрытии, являются те, которые обычно используются для приготовления композиций. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения указанными, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбитол, маннитол, крахмал, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать одну или несколько добавок, выбранных из группы, состоящей из смазочных агентов, смачивающих агентов, подсластителей, ароматизаторов, эмульгирующих агентов, суспендирующих агентов и консервантов. Подробную информацию о подходящих фармацевтически приемлемых носителях и композициях можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Фармацевтическая композиция по изобретению разработана таким образом, чтобы быть пригодной для предполагаемого пути введения. Примеры подходящих парентеральных путей введения включают внутривенную инъекцию, трансдермальное введение, подкожную инъекцию, внутримышечную инъекцию, интравитреальную инъекцию, субретинальную инъекцию, супрахориоидальную инъекцию, введение глазных капель, интрацеребровентрикулярную инъекцию, интратекальную инъекцию, внутрименингеальную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрисуставную инъекцию, внутрисердечную инъекцию, интракавернозную инъекцию, внутримозговую инъекцию, интрацистермальную инъекцию, интракоронарную инъекцию, внутричерепную инъекцию, интрадуральную инъекцию, эпидуральную инъекцию, интрагиппокампальную инъекцию, интраназальное введение, внутрикостную инъекцию, интраперитонеальную инъекцию, интраплевральную инъекцию, интраспинальную инъекцию, интраторакальную инъекцию, интраимическую инъекцию, внутриматочное введение, интравагинальное введение, интравентрикулярную инъекцию, интравезикальную инъекцию, субконъюнктивальную инъекцию, внутриопухолевую инъекцию, местное введение, интраперитонеальную инъекцию и их комбинации.

В некоторых аспектах фармацевтическую композицию применяют в суточной дозе от 0,0001 до 100 мг/кг.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или наполнителями. Фармацевтическая композиция может быть представлена в однократных лекарственных формах или разлита в многократные контейнеры. Препарат

может быть в форме раствора, суспензии или эмульсии в масляной или водной среде, или может быть в форме экстракта, порошка, гранул, таблетки или капсулы. Препарат может дополнительно включать диспергатор или стабилизатор.

VI. Наборы

Также в настоящей заявке раскрыты наборы, содержащие один или несколько полинуклеотидов, как описано здесь (например, содержащие трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), один или несколько векторов (например, гAAV), как раскрыто здесь, одну или несколько клеток, как раскрыто здесь, любую фармацевтическую композицию, как раскрыто здесь, или любую их комбинацию. В некоторых аспектах набор также содержит инструкции по применению любого из вышеупомянутых средств или их комбинации у субъекта, нуждающегося в этом.

Термины «набор» и «система», используемые в настоящей заявке, предназначены для обозначения по меньшей мере одного или нескольких полинуклеотидов, как описано здесь, одного или нескольких векторов (например, гAAV), как описано здесь, одной или нескольких клеток-хозяев, как описано здесь, любой фармацевтической композиции, как описано здесь, или любой их комбинации, которые в некоторых аспектах находятся в комбинации с одним или несколькими другими типами элементов или компонентов (например, другими типами биохимических реагентов, контейнеров, упаковок, таких как упаковка, предназначенная для коммерческой продажи, инструкции по применению и тому подобное).

VII. Применение и способы

VII.A. Способы получения

Также в настоящей заявке раскрыты способы получения полипептида, кодируемого трансгеном. В некоторых аспектах такой способ включает культивирование описанной здесь клетки (например, трансдуцированной полинуклеотидом, содержащим трансген и нетранслируемую молекулу нуклеиновой кислоты) в подходящих условиях и выделение кодируемого белка. В определенных аспектах способ получения полипептида, кодируемого трансгеном, включает введение полинуклеотида по настоящему изобретению (например, содержащего трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную молекулу) субъекту, нуждающемуся в этом, таким образом, что кодируемый полипептид продуцируется у субъекта. Дополнительное раскрытие, относящееся к такому способу получения полипептида *in vivo*, представлено в другом месте настоящего изобретения (см., например, терапевтическое применение).

В некоторых аспектах настоящее раскрытие предоставляет способы получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего описанный в

настоящей заявке полинуклеотид (например, содержащий трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность). В некоторых аспектах способ получения такого рекомбинантного AAV включает культивирование клетки, которая была трансфицирована вектором AAV, описанным здесь, в условиях, при которых получают рекомбинантный AAV. В некоторых аспектах способ дополнительно включает выделение рекомбинантного AAV из надосадочной жидкости клеточной культуры.

В некоторых аспектах рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор может быть сконструирован с использованием (i) конструкции AAV, содержащей трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность (см., например, Фиг.6С), (ii) конструкцию, содержащую гены гер и сар, и (iii) хелперную конструкцию для трансдукции трансгена в клетку-хозяина. В таком аспекте хелперная конструкция может содержать ген E2A, который способствует репликации генома AAV и транскрипции гена, ген E4, который позволяет мРНК AAV перемещаться из ядра в цитоплазму, и область VA, которая продуцирует две РНК VA, служащие для регулирования трансляции.

В некоторых аспектах вышеописанные три конструкции могут быть заменены двумя конструкциями для трансдукции в клетку-хозяина. В таких аспектах конструкция AAV содержит трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, а отдельная конструкция содержит гены гер и сар, ген E2A, ген E4 и область VA. Дополнительные способы получения частиц AAV, описанные в настоящей заявке, в целом известны в данной области техники. См., например, Clement et al., Mol Ther Methods Clin Dev 3: 16002 (Mar. 2016); Clark, Kidney Int. 61: S9-15 (Jan. 2002); и Xiao et al., J Virol 72(3): 2224-32 (Mar. 1998); каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

VII.B. Терапевтическое применение

Молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке (например, содержащие трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), векторы и рекомбинантные вирусы (например, гAAV), содержащие такие молекулы нуклеиновой кислоты, и способы, описанные здесь, имеют множество полезных приложений *in vitro* и *in vivo*. Например, описанные в настоящей заявке полинуклеотиды, например, вектор, например, вектор AAV, можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для лечения заболеваний. Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает использование любого из полинуклеотидов, как описано в настоящей заявке (например, содержащих трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), рекомбинантной экспрессионной конструкции, как описано здесь, клеток, как описано

здесь, фармацевтических композиций, как описано здесь, или рекомбинантного вируса, как описано здесь, для терапевтического применения.

В некоторых аспектах в настоящей заявке раскрыт способ экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту полинуклеотида, как описано здесь (например, содержащего трансген и нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность), вектора, как описано здесь, рекомбинантного вируса (например, гAAV), как описано здесь, клетки, как описано здесь, или фармацевтической композиции, как описано здесь, где после введения у субъекта повышается экспрессия трансгена.

Как описано в настоящей заявке, нетранслируемые нуклеиновокислотные последовательности по настоящему раскрытию позволяют увеличивать экспрессию трансгена, когда трансген транслируется. Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ увеличения экспрессии трансгена в клетке, включающий обеспечение контакта клетки с любым из полинуклеотидов, векторов или рекомбинантных вирусов (например, гAAV), как раскрыто здесь. Контакт может быть осуществлен *ex vivo* или *in vivo*. Когда контакт происходит *in vivo*, способ может дополнительно включать введение субъекту любого из полинуклеотидов, векторов или рекомбинантных вирусов перед контактом.

В некоторых аспектах после контакта экспрессия трансгена увеличивается по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, или по меньшей мере примерно в 10 раз или более по сравнению с эталонной экспрессией. В некоторых аспектах эталонная экспрессия представляет собой экспрессию трансгена в клетке до контакта. В некоторых аспектах эталонная экспрессия представляет собой экспрессию трансгена в соответствующей клетке, которая не контактировала с полинуклеотидом, вектором или рекомбинантным вирусом, описанным в настоящей заявке (например, либо не имеет нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности, либо содержит последовательность нуклеотидов, указанную в SEQ ID NO: 1).

Другой аспект настоящего изобретения обеспечивает способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий применение у субъекта эффективного количества любого из полинуклеотидов, векторов, клеток, рекомбинантных вирусов или фармацевтических композиций. Как очевидно из настоящего изобретения, композиции, описанные здесь (например, полинуклеотиды, рекомбинантные экспрессионные конструкции, клетки, фармацевтические композиции или рекомбинантные вирусы), могут быть использованы для лечения любого интересующего заболевания, например, путем модификации трансгена.

Заболевания, которые могут быть предотвращены, облегчены или излечены с помощью настоящего изобретения, не ограничены и включают все заболевания, которые требуют уменьшенного числа введений лекарственного средства. Неограничивающий пример такого заболевания включает офтальмологические заболевания. В некоторых аспектах офтальмологические заболевания выбраны из диабетической ретинопатии, хориоидальной неоваскуляризации, макулярной дегенерации, дегенерации сетчатки, макулярного отека, отека сетчатки, макулярной отечности или их комбинаций.

В некоторых аспектах офтальмологическое заболевание, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает макулярную дегенерацию. В некоторых аспектах макулярная дегенерация включает возрастную макулярную дегенерацию (ВМД). Возрастную макулярную дегенерацию можно разделить на сухую (атрофическую) макулярную дегенерацию и влажную (неоваскулярную или экссудативную) макулярную дегенерацию. Возрастную макулярную дегенерацию также можно разделить на раннюю ВМД, промежуточную ВМД и позднюю или прогрессирующую ВМД (географическую атрофию). В некоторых аспектах офтальмологическое заболевание, которое можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает диабетическую ретинопатию. В некоторых аспектах диабетическая ретинопатия является непролиферативной диабетической ретинопатией (НПДР). В некоторых аспектах диабетическая ретинопатия является пролиферативной диабетической ретинопатией (ПДР). В некоторых аспектах диабетическая ретинопатия является диабетической макулопатией. В некоторых аспектах диабетическая ретинопатия представляет собой диабетический макулярный отек. В некоторых аспектах диабетическая ретинопатия представляет собой любую ретинопатию, связанную с ишемическим повреждением сетчатки. Если не указано иное, настоящее изобретение может быть использовано для лечения всех форм ВМД и/или диабетической ретинопатии.

Другой аспект настоящего изобретения обеспечивает генное терапевтическое средство или способ лечения заболевания, который позволяет достигать устойчивой

экспрессии трансгена.

Использование описанной в настоящей заявке вирусной системы доставки позволяет вводить описанную здесь композицию (например, полинуклеотиды, рекомбинантные экспрессионные конструкции, клетки, фармацевтические композиции или рекомбинантные вирусы) с интервалами примерно 1 неделю, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 1 месяц, примерно 2 месяца, примерно 3 месяца, примерно 4 месяца, примерно 5 месяцев, примерно 6 месяцев, примерно 7 месяцев, примерно 8 месяцев, примерно 9 месяцев, примерно 10 месяцев, примерно 11 месяцев или примерно 1 год или более. В некоторых аспектах интервал составляет от 2 до 3 месяцев. В некоторых аспектах интервал составляет примерно 6 месяцев. В некоторых аспектах интервал составляет примерно 1 год. В некоторых аспектах интервал составляет по меньшей мере примерно 1 год. То есть, использование описанной в настоящей заявке системы доставки вируса приводит к резкому снижению частоты введения композиции, позволяя врачу, пациенту или субъекту избежать ощущения дискомфорта, вызванного повторным введением композиции. В зависимости от симптомов или потребностей пациента композицию можно первоначально вводить по меньшей мере 2 или 3 раза с интервалами от 1 до 2 недель, а затем один раз в 2-3 месяца, один раз в 6 месяцев или один раз в год или реже.

Настоящее изобретение будет более конкретно объяснено со ссылкой на следующие примеры. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что объем настоящего изобретения не ограничен этими примерами в соответствии с сутью настоящего раскрытия.

Краткое описание чертежей

Эти и/или другие аспекты и преимущества настоящего изобретения станут очевидными и более понятными из следующего описания аспектов, взятого в сочетании с прилагаемыми чертежами, где:

На Фигуре 1 показана карта расщепления экспрессионной конструкции рAAV-eGFP, как описано в настоящей заявке.

Фигуры 2А и 2В показывают увеличение экспрессии eGFP в клетках, трансдуцированных экспрессионными конструкциями, включающими полноразмерный интрон EF-1 α в комбинации с промотором EF-1 α («CEE-FL»). Контрольные клетки трансдуцировали соответствующими экспрессионными конструкциями, в которых отсутствовал интрон EF-1 α («CE»). На Фигуре 2А использовали экспрессионные конструкции клеток животных, лишенные ITR. На Фигуре 2В были использованы ITR-содержащие экспрессионные конструкции рAAV. На обеих Фигурах 2А и 2В экспрессия

eGFP показана в следующих трансдуцированных клеточных линиях (HEK293, HeLa, ARPE-19, RPE-1, Huh-7 и Hep3B).

На Фигурах 3А, 3В и 3С показана экспрессия eGFP в клетках, трансдуцированных экспрессионными конструкциями, включающими полноразмерный интрон EF-1 α в комбинации с различными промоторами («CCE-FL»). Контрольные клетки трансдуцировали соответствующими экспрессионными конструкциями, но без интрона EF-1 α . На Фигуре 3А комбинация энхансера CMV и промотора CMV была введена в экспрессионные конструкции клеток животных (т.е. без ITR) и использована для трансдукции клеток. На Фигуре 3В комбинацию энхансера CMV и промотора CMV вводили в экспрессионные конструкции pAAV и использовали для трансдукции клеток. На Фигуре 3С клетки трансдуцировали экспрессионными конструкциями клеток животных, содержащими комбинацию энхансера CMV и промотора куриного β -актина. На каждой из Фигур 3А, 3В и 3С экспрессия eGFP показана в следующих трансдуцированных клеточных линиях (HEK293, HeLa, ARPE-19, RPE-1, Huh-7 и Hep3B).

Фигуры 4А и 4В показывают повышающий или понижающий эффект различных последовательностей интронных фрагментов EF-1 α (т.е. нетранслируемых нуклеиновокислотных последовательностей, описанных в настоящей заявке) в отношении экспрессии генов. Фигура 4А схематично показывает серию конструкций CEE, полученных путем последовательного усечения интронной последовательности EF-1 α . Каждая из показанных конструкций включала следующее: (1) энхансер CMV (380 пар оснований); (2) промотор, содержащий промоторную часть CMV (первые 31 пары оснований с 5'-конца) и промотор EF-1 α (201 пара оснований); и (3) экзонную последовательность 1 (E1) EF-1 α (29 пар оснований). Контрольная конструкция «CE» не включала никаких дополнительных компонентов, в том числе интронную последовательность EF-1 альфа. Другие конструкции дополнительно включали следующие дополнительные компоненты: (4) донорную последовательность сплайсинга, которая состояла из первых 19 пар оснований с 5'-конца полноразмерной интронной последовательности EF-1 альфа (т.е. SEQ ID NO: 1); (5) интронную последовательность EF-1 α ; и (6) экзонную последовательность 2 (E2) EF-1 α (девять пар оснований). Интронные последовательности EF-1 α включали полноразмерную последовательность (924 пары оснований) («CEE-FL»); (ii) нуклеотиды 570-924 из SEQ ID NO: 1 (355 пар оснований) («CEE-T2»); (iii) нуклеотиды 721-924 из SEQ ID NO: 1 (204 пары оснований) («CEE-T3»); (iv) нуклеотиды 808-924 из SEQ ID NO: 1 (117 пар оснований) («CEE-T3.1»); (v) нуклеотиды 830-924 из SEQ ID NO: 1 (95 пар оснований) («CEE-T3.1.1»); (vi) нуклеотиды 852-924 из SEQ ID NO: 1 (73 пары оснований) («CEE-T3.1.2»); (vii)

нуклеотиды 874-924 из SEQ ID NO: 1 (51 пара оснований) («CEE-T3.2»); и (viii) нуклеотиды 896-924 из SEQ ID NO: 1 (29 пар оснований) («CEE-T4»). Общая длина каждой из конструкций приведена справа. На Фигуре 4В показано влияние различных интронных последовательностей EF-1 α (полноразмерных или усеченных) на экспрессию eGFP (т.е. трансгена) в пяти различных клеточных линиях (HeLa, Hep3B, Huh-7, ARPE-19 и RPE-1). Клетки ARPE-19 и RPE-1 получены из сетчатки. Клетки Huh-7 и Hep3B получены из печени. Клетки HeLa получены из шейки матки. Экспрессия eGFP показана в процентах от экспрессии, наблюдаемой в клетках, трансдуцированных трансгеном с использованием конструкции CEE-FL. «ns» = недостоверно. "***" = $p < 0,01$ и "****" = $p < 0,001$.

На Фигурах 5А, 5В, 5С и 5D показаны способности интронных фрагментов EF-1 α Т3.1.1 (т.е. нуклеотидов 830-924 из SEQ ID NO: 1 (95 пар оснований)) и Т3.1.2 (т.е. нуклеотидов 852-924 из SEQ ID NO: 1 (73 пары оснований)) к увеличению экспрессии трансгена. На Фигуре 5А схематически показана серия конструкций САЕ, включающая интронные фрагменты EF-1 α Т3.1.1 и Т3.1.2 в комбинации со следующими дополнительными компонентами: (1) энхансер CMV (380 пар оснований); (2) промотор куриного β -актина (279 пар оснований); (3) экзонная последовательность 1 (Е1) куриного β -актина (32 пары оснований); (4) экзонная последовательность 1 (Е1) EF-1 α (29 пар оснований); (5) донорная последовательность сплайсинга, которая состояла из первых 19 пар оснований с 5'-конца полноразмерной интронной последовательности EF-1 α (т.е. SEQ ID NO: 1); и (6) экзонная последовательность 2 (Е2) EF-1 α (9 пар оснований). Контрольная конструкция «СА» включала только энхансер CMV, промотор куриного β -актина и последовательность Е1 куриного β -актина. Контрольная конструкция «САЕ-FL» включала полноразмерную интронную последовательность EF-1 α . Общая длина конструкций приведена слева. На Фигуре 5В показана экспрессия eGFP (т.е. трансгена) в клетках HeLa (левый график) и ARPE-19 (правый график), трансдуцированных с использованием конструкций САЕ-Т3.1.1 и САЕ-Т3.1.2. Экспрессия гена показана в процентах от экспрессии в соответствующих клетках, трансдуцированных с использованием конструкции СА (т.е. отсутствовала какая-либо интронная последовательность EF-1 α). На Фигуре 5С схематически показана серия гибридных интронных СА-конструкций (т.е. конструкций СА-Т3.1.1 и СА-Т3.1.2), включающих как интронный фрагмент EF-1 α Т3.1.1 или Т3.1.2, так и интронный фрагмент куриного β -актина. Две конструкции дополнительно включали: (1) энхансер CMV; (2) промотор куриного β -актина; (3) последовательность Е1 куриного β -актина; и (4) последовательность Е2 EF-1 α . Контрольная конструкция «CAG-FL» включала следующее: (1) энхансер CMV (380 пар

оснований); (2) промотор куриного β -актина (279 пар оснований); (3) последовательность E1 куриного β -актина (93 пары оснований); (4) химерный интрон (содержащий интрон из куриного β -актина и кроличьего β -глобина) (924 пары оснований); и (5) экзонную последовательность 3 (E3) кроличьего β -глобина (48 пар оснований). Конструкция «CA» является такой же, как описано на Фигуре 5А. Фигура 5D показывает экспрессию eGFP в клетках HeLa (левый график) и Нер3В (правый график), трансдуцированных с использованием конструкций CA-T3.1.1 и CA-T3.1.2. Экспрессия гена показана в процентах от экспрессии в соответствующих клетках, трансдуцированных с использованием конструкции CA (т.е. без какой-либо интронной последовательности EF-1 α).

На Фигурах 6А, 6В и 6С показано повышающее влияние интронных фрагментов EF-1 α T3.1.1 и T3.1.2 на экспрессию трансгена (т.е. афлиберцепта), когда AAV использовали для доставки гена. На Фигуре 6А показано повышающее влияние фрагментов T3.1.1 и T3.1.2 на экспрессию генов при доставке генов *in vitro*, на Фигуре 6В показано повышающее влияние фрагментов T3.1.1 и T3.1.2 на экспрессию генов при доставке генов *in vivo*. Фигура 6С представляет собой карту расщепления вектора pAAV-CA-T3.1.1, в который был введен афлиберцепт в качестве трансгена.

Способ для изобретения

Материалы и методы

Пример 1. Получение конструкции pAAV-eGFP, не включающей последовательности энхансер-промотор-интрон.

Пример 1-1. Вставка сигнальной последовательности полиаденилирования bGH

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием конструкции pCDNA5/FRT/TO (Invitrogen, США, Кат. № V6520-20) в качестве матрицы и олиго #001 и #002 для получения фрагмента последовательности сигнала полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (poly A). Затем поли А гормона роста человека (hGH) удаляли и вставляли поли А bGH, используя сайты BglII/BstEII плазмиды без промотора pAAV-MCS (Cellbiolabs, США, Кат. № VPK-411).

Пример 1-2. Вставка eGFP

eGFP, оптимизированный по кодам человека, был получен из конструкции pUCIDT-KAN-eGFP (GeneArt, Германия) и клонирован в сайты BamHI/HindIII конструкции pAAV- bGH, полученной в Примере 1-1.

Пример 1-3. Вставка последовательности WPRE

Последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка была получена из конструкции pUC57-WPRE (GenScript, США) и

клонирована в сайты HindIII/BglIII конструкции pAAV- eGFP- bGH, полученной в примере 1-2.

Пример 1-4. Вставка 4 копий последовательностей-мишеней miRNA142-3p

Олиго #003 и #004 отжигали, а Олиго #005 и #006 отжигали для получения двух фрагментов ДНК, каждый из которых состоял из 2 копий последовательностей-мишеней miRNA142-3p. Два коротких фрагмента ДНК были клонированы в сайты HindIII/SalI конструкции pAAV-eGFP-WPRE- bGH, полученной в Примере 1-3, таким образом, что было вставлено в общей сложности 4 копии последовательностей-мишеней miRNA142-3p. В результате была получена конструкция pAAV-eGFP, не включающая последовательности энхансер-промотор-интрон (Фигура 1).

Пример 2. Получение конструкций, включающих различные типы последовательностей энхансер-промотор-интрон

Пример 2-1. Получение конструкций, включающих серии CEE (CEE-FL, CEE-T2, -T3, -T3.1, -T3.1.1, -T3.1.2, -T3.2, -T4) и последовательностей CE

Пример 2-1-1. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность CEE-FL (полноразмерную).

Фрагмент ДНК CEE-FL (энхансер CMV (SEQ ID NO: 4)-31 п.н., промотор CMV (SEQ ID NO: 5) -промотор EF-1 α (SEQ ID NO: 7) -29 п.н. экзон 1 EF-1 α (SEQ ID NO: 13) -интрон EF-1 α (SEQ ID NO: 1)-9 п.н. EF-1 α экзон 2 (SEQ ID NO: 11)) был получен из конструкции pMK-RQ3_PEM (GeneArt, Германия) и клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции, полученной в Примере 1.

Пример 2-1-2. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность CEE-T2

ПЦР проводили с использованием конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, в качестве матрицы, и комбинаций олиго #007/008 и олиго #009/010. Полученные два фрагмента ДНК лигировали с помощью Gibson Assembly® (NEB, США, Кат. № E2611) для получения конструкции, имеющей последовательность CEE-T2.

Пример 2-1-3. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность CEE-T3

ПЦР проводили с использованием конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, в качестве матрицы и комбинаций олиго #011/008 и олиго #012/010. Полученные два фрагмента ДНК лигировали с помощью сборки Гибсона для получения конструкции, имеющей последовательность CEE-T3.

Пример 2-1-4. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность CEE-T3.1

ПЦР проводили с использованием конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, в качестве матрицы, и комбинаций олиго #013/008 и олиго #014/010. Полученные два фрагмента ДНК лигировали с помощью сборки Гибсона для получения конструкции, имеющей последовательность СЕЕ-Т3.1.

Пример 2-1-5. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность СЕЕ-Т3.2

ПЦР проводили с использованием конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, в качестве матрицы, и комбинаций олиго #015/008 и олиго #016/010. Полученные два фрагмента ДНК лигировали с помощью сборки Гибсона для получения конструкции, имеющей последовательность СЕЕ-Т4.

Пример 2-1-6. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность СЕЕ-Т4

ПЦР проводили с использованием конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, в качестве матрицы, и комбинаций олиго #017/008 и олиго #018/010. Полученные два фрагмента ДНК лигировали с помощью сборки Гибсона для получения конструкции, имеющей последовательность СЕЕ-Т4.

Пример 2-1-7. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность СЕЕ-Т3.1.1

Нуклеотидная последовательность СЕЕ-Т3.1.1 была получена из конструкции рUC57-Т3.1.1 (GenScript, США) и клонирована в сайты EcoRI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-1-1.

Пример 2-1-8. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность СЕЕ-Т3.1.2

Нуклеотидная последовательность СЕЕ-Т3.1.2 была получена из конструкции рUC57-Т3.1.2 (GenScript, США) и клонирована в сайты EcoRI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-1-1.

Пример 2-1-9. Получение конструкции, включающей нуклеотидную последовательность СЕ

Фрагмент СЕ был получен из конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1, путем ПЦР с использованием олиго #019 и #020 и клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-1-1.

Пример 2-2. Получение конструкции, включающей последовательность ССЕ-FL, и конструкции, включающей последовательность СС

Пример 2-2-1. Получение конструкции, включающей последовательность ССЕ-FL

Фрагмент ДНК, имеющий последовательность ССЕ-FL (энхансер CMV (SEQ ID

NO: 4)-промотор CMV (SEQ ID NO: 6) -30 п.н. экзон 1 CMV (SEQ ID NO: 12) -29 п.н. экзон 1 EF-1 α (SEQ ID NO: 13) - интрон EF-1 α (SEQ ID NO: 1)-9 п.н. экзон 2 EF-1 α (SEQ ID NO: 11)) был получен из конструкции pMK-RQ4_PME (GeneArt, Германия). Фрагмент ДНК был клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции pAAV-eGFP, полученной в Примере 1.

Пример 2-2-2. Получение конструкции, включающей последовательность СС

Фрагмент СС был получен из конструкции, приготовленной в Примере 2-2-1, путем ПЦР с использованием олиго #019 и #021 и клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-2-1.

Пример 2-3. Получение конструкции, включающей последовательность CAG-FL, конструкции, включающей последовательность CA-T3.1.1, конструкции, включающей последовательность CA-T3.1.2, и конструкции, включающей последовательность СА

Пример 2-3-1. Получение конструкции, включающей последовательность CAG-FL

Фрагмент CAG был получен из конструкции pCAG-Neo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Япония, Кат. № 163-25601) и клонирован в сайты SnaBI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-1.

Пример 2-3-2. Получение конструкции, включающей последовательность СА

Фрагмент СА был получен из конструкции pUC57-CA (GenScript, США) и клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-3-1.

Пример 2-3-3. Получение конструкции, включающей последовательность СА-T3.1.1

Фрагмент Т3.1.1 был получен из конструкции, приготовленной в Примере 2-1-7, путем ПЦР с использованием олиго #022 и #023, и клонирован в сайты AfeI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-3-1.

Пример 2-3-4. Получение конструкции, включающей последовательность СА-T3.1.2

Фрагмент Т3.1.2 был получен путем отжига олиго #024 и #025, и клонирован в сайты AfeI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-3-1.

Пример 2-4. Получение конструкции, включающей последовательность CAE-FL, конструкции, включающей последовательность CAE-T3.1.1, и конструкции, включающей последовательность CAE-T3.1.2

Пример 2-4-1. Получение конструкции, включающей последовательность CAE-FL

Фрагмент CAE (энхансер CMV (SEQ ID NO: 4) - промотор куриного β -актина (SEQ ID NO: 8) - 32 п.н. экзон 1 куриного β -актина (SEQ ID NO: 14) - 29 п.н. экзон 1 EF-1 α (SEQ ID NO: 13) -924 п.н. интрон EF-1 α (SEQ ID NO: 1)-9 п.н. экзон 2 EF-1 α (SEQ ID NO: 11))

был получен из конструкции pUC57-CAE (GenScript, США) и клонирован в сайты EcoRI/BamHI конструкции, полученной в Примере 1.

Пример 2-4-2. Получение конструкции, включающей последовательность CAE-T3.1.1

Фрагмент CAE-T3.1.1 был получен из конструкции, приготовленной в Примере 2-1-7, с использованием олиго #026 и #027, и клонирован в сайты KpnI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-1-7.

Пример 2-4-3. Получение конструкции, включающей последовательность CAE-T3.1.2

Фрагмент CAE-T3.1.2 был получен из конструкции, приготовленной в Примере 2-1-8, с использованием олиго #026 и #027, и клонирован в сайты KpnI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-1-8.

Пример 2-5. Получение конструкций рAAV, включающей афлиберцепт

Фрагмент ДНК афлиберцепта был получен из конструкции pcDNA3.1(+)-IgG-афлиберцепта (Genscript, США) методом ПЦР с использованием олиго #028 и #029, и клонирован в сайты BamHI/HindIII каждой из конструкций, полученных в Примерах 2-3-1, 2-3-3, 2-3-4, 2-4-1, 2-4-2, и 2-4-3.

Пример 2-6. Получение экспрессионных конструкций животных клеток без последовательности ITR

Пример 2-6-1. Получение конструкции pcDNA3.1(+)-eGFP

Конструкцию, приготовленную в Примере 1, разрезали с помощью BamHI/AfeI для получения фрагмента eGFP, который затем клонировали в сайты BamHI/EcoRV конструкции pcDNA3.1(+).

Пример 2-6-2. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность CEE-FL

Конструкцию, приготовленную в Примере 2-1-1, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента CEE, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-6-1.

Пример 2-6-3. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность CE

Конструкцию, приготовленную в Примере 2-1-9, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента CE, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-6-1.

Пример 2-6-4. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность CCE-FL

Конструкцию, приготовленную в Примере 2-2-1, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента SSE, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, приготовленной в Примере 2-6-1.

Пример 2-6-5. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность SS

Конструкцию, полученную в Примере 2-2-2, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента SS, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-6-1.

Пример 2-6-6. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность CAE-FL

Конструкцию, полученную в Примере 2-4-1, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента CAE, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-6-1.

Пример 2-6-7. Получение экспрессионной конструкции животных клеток, включающей последовательность SA

Конструкцию, полученную в Примере 2-3-2, разрезали с помощью NdeI/BamHI для получения фрагмента SA, который затем клонировали в сайты NdeI/BamHI конструкции, полученной в Примере 2-6-1.

Пример 2-7. Секвенирование

Нуклеотидные последовательности всех конструкций, полученных путем клонирования, были проверены с помощью секвенирования ДНК (Macrogen, Корея или Bionics, Корея).

Пример 3. Культура клеток

Клеточные линии HEK293 и HeLa культивировали в среде MEM (Gibco, США, Кат. № 42360-032) при увлажнении при 5% CO₂ и 37°C, клеточную линию ARPE-19 культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США, Кат. № 11330-032) при увлажнении при 5% CO₂ и 37°C, а клеточные линии RPE-1 и Hep3B культивировали в среде DMEM (Gibco, США, Кат. № 10569-010) при увлажнении при 5% CO₂ и 37°C. Все среды были дополнены 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Gibco, США, Кат. № 16000-044) и 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США, Кат. № 15140-163). Клеточную линию Epxi293 культивировали в среде Epxi293 (Gibco, США, Кат. № A14351-01) с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина при встряхивании (250 об/мин) при увлажнении при 8% CO₂ и 37°C.

Пример 4. Трансдукция

Пример 4-1. Трансдукция адгезивных клеток

Каждую из клеточных линий дважды промывали DPBS (Gibco, США, Кат. № 14190-250), отделяли от культуральной чашки обработкой трипсином-ЭДТА (Gibco, США, Кат. № 25200-114) и высевали в 12-луночный планшет до слияния 80%. После 24-часового культивирования липофектамин 3000 (Thermo Fisher Scientific, США, Кат. № L300075) использовали для трансдукции плазмидной ДНК в клетки.

Пример 4-2. Трансдукция суспензионных клеток для продукции AAV

Для получения AAV 6×10^8 клеток высевали в 220 мл среды exрi293 в 1-литровую культуральную колбу Эрленмейера. После ~3-4 часов культивирования для стабилизации плазмидную ДНК рHelper, плазмидную ДНК рUC-RC2, плазмидную ДНК рUC-RC2 или плазмидную ДНК рUC-RC8 и плазмидную ДНК конструкции AAV, содержащую трансен (каждая 3,73 пмоль), растворяли в 10 мл Opti-MEM (Gibco, США, Кат. № 51985-034). Сразу после того, как полиэтиленимин (PEI, Polyscience, США, Кат. № 23966-1) был разбавлен 10 мл Opti-MEM, два раствора смешивали для приготовления раствора для трансдукции. ПЭИ использовали в количестве, соответствующем удвоенному общему количеству ДНК. После инкубации при комнатной температуре в течение 30 мин в колбу для культивирования добавляли в общей сложности 20 мл раствора для трансдукции.

Пример 5. Очистка AAV

Пример 5-1. Очистка AAV2

Через 72 часа после трансдукции (Пример 4-2) собирали раствор для культивирования клеток с последующим центрифугированием для удаления среды. Осажденные клетки промывали DPBS и ресуспендировали в 16 мл DPBS. Клетки лизировали с помощью трех циклов замораживания/размораживания и центрифугировали для получения надосадочной жидкости, содержащей AAV2. Надосадочную жидкость смешивали с реагентом повышенной концентрации ТМ (System Bioscience, США, Кат. № AAV110A-1) в соотношении 4:1 при 4°C в течение 16 часов с последующим центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок, содержащий AAV2, промывали 500 мкл Opti-MEM. После полного удаления надосадочной жидкости осадок повторно суспендировали в 400 мкл охлажденного со льдом DPBS для получения AAV.

Пример 5-2. Очистка AAV8

Через 72 часа после трансдукции (Пример 4-2) собирали раствор для культивирования клеток, фильтровали через фильтр 0,45 мкм для удаления остатков клеток и подвергали анионообменной и аффинной хроматографии для получения AAV.

Пример 6. Определение титра AAV

Титр AAV2, очищенного в Примере 5, определяли методом кПЦР (Bio-Rad, США, CFX96). Сначала AAV обрабатывали ДНКазой I в реакционном буфере ДНКазы I (New

England Biolab, США, M0303S) при 37°C в течение 1 часа. После этого обработанный ДНКазой I образец обрабатывали протеиназой K (Invitrogen, США, Кат. № AM2548) при 55°C в течение 30 минут, и инкубировали при 95°C в течение 15 минут для инактивации протеиназы K. Подготовленные образцы использовали в качестве матриц для кПЦР, а конструкции AAV использовали для построения стандартной кривой ($7,4 \times 10^8$ - $7,4 \times 10^4$, 10-кратное разведение). В качестве положительного контроля использовали стандартный раствор рекомбинантного аденоассоциированного вируса 2 (rAAV2-RSS, ATCC, США, Кат. № VR-1616) или стандартный раствор рекомбинантного аденоассоциированного вируса 8 (rAAV8-RSS, ATCC, США, Кат. № VR-1816). Для определения титра кПЦР проводили с использованием 2XSSO усовершенствованного универсального зонда Supermix (Bio-Rad, США, Кат. № 172-5282) и специфичных для AAV2-ITR праймеров (#030, #031) и зонда (#032, FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-BHQ1). кПЦР повторяли 40 раз. Каждый цикл кПЦР состоял из денатурации при 95°C в течение 10 мин, инкубации при 95°C в течение 30 сек и последующей инкубации при 60°C в течение 1 мин. Стандартная кривая и количественное определение были проанализированы с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad, США).

Пример 7. Трансдукция in vitro с AAV2

Клетки НЕК293 высевали в 24-луночный культуральный планшет с плотностью 4×10^5 клеток/лунку. Через 24 часа после посева каждую лунку обрабатывали MG132 (Sigma-Aldrich, США, Кат. № M7449) в концентрации 5 мкМ в течение 8 часов. Для трансдукции AAV2 обрабатывали при множественности инфицирования (MOI) 25 000 и культивировали в течение 72 часов.

Пример 8. Трансдукция in vivo с AAV8

Нижнюю часть глаза перфорировали иглой шприца 31G и вводили иглу (набор из 10) в отверстие. Введение останавливали в точке, где кончик иглы достигал стенки глаза, а затем проводили введение. Об успехе субретинальной инъекции судили по наблюдению образования пузырьков сетчатки на ОКТ сразу после введения. Через 4 недели глаз извлекали, и добавляли и 200 мкл раствора RIPA (Thermo Fisher Scientific, США, Кат. № 89900) с добавлением коктейля ингибиторов протеазы Halt® 100X (Thermo Fisher Scientific, США, Кат. № 78429). Глаз измельчали до суспензии с помощью тканевого измельчителя (Axygen, кат. № 14-222-358). После инкубации при 4°C в течение 1 часов суспензию центрифугировали при 13000 g и 4°C в течение 15 минут. Надосадочную жидкость собирали и анализировали.

Пример 9. Измерение экспрессии GFP методом проточной цитометрии

Экспрессию eGFP измеряли методом проточной цитометрии (Beckman Coulter,

США, CytoFlex). Измеренное значение для eGFP рассчитывали путем корректировки эффективности трансдукции с измерением красной флуоресценции с помощью конструкции pCMV-DsRed с совместной трансдукцией (Clontech, Япония, кат. № 632416). Через 72 часа после трансдукции клетки промывали DPBS и отделяли трипсином. Клетки собирали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 минут и ресуспендировали в 500 мкл DPBS с добавлением 2% ЭТС. Для проточной цитометрии выделяли области отдельных клеток на основе графика FSC против SSC. Среди них были измерены FL1-A (зеленый) и FL2-A (красный). Калибровку проводили с образцами, трансдуцированными одиночными флуоресцентными векторами (pEGFP-C1, Clontech, Япония, кат. № PT3286-1 и pCMV-DsRed-Expression2), и значения были отражены в результатах измерений. Все результаты проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 10.5.3 (Becton Dickinson & Company, США).

Пример 10. Измерение уровня экспрессии афлиберцепта методом ELISA

Уровни секреторных белков определяли количественно с помощью ELISA. Через 48 часов после трансдукции с AAV получали раствор для культивирования клеток и центрифугировали при 1500 об/мин и 4°C в течение 5 минут. Надосадочную жидкость собирали и использовали в качестве образца для ELISA. ELISA для афлиберцепта (Eagle bioscience, США, кат. No. IG-AA115) был выполнен в соответствии с протоколом производителя. Результаты ELISA измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали с помощью программного обеспечения SkanIt (Thermo Fisher Scientific, США). Серия из двух экспериментов с использованием клеточных линий была проведена в двух экземплярах. Эксперимент на животных проводили один раз на каждый глаз.

Пример 11. Статистический анализ

Все эксперименты с использованием клеточных линий, за исключением ELISA, проводили в трех повторах. Результаты были проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.1.1 (GraphPad Software, Inc., США), сравнения между двумя группами проводили с использованием t-тестов Стьюдента, а сравнения между тремя группами или более проводили с помощью одностороннего ANOVA. В экспериментах на животных статистические различия определяли с помощью критерия Уилкоксона для связанных выборок и метода знаков. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Таблица 1

Олиго NO	SEQ ID NO	Последовательность (5'→3')
001	24	GGAAGATCTCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
002	25	CACGTGGTTACCCCATAGAGCCCACCGCATC
003	26	AGCTTTCATAAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAA GTAGGAAACACTACAACGTTT
004	27	TAGTGTTCCTACTTTATGGAATCGTGTAGTGTTCCTACTT TATGGA
005	28	CATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAA ACACTACAG
006	29	TCGACTGTAGTGTTCCTACTTTATGGAGTGATGTAGTGT TCCTACTTTATGGAACGTTG
007	30	GTGTGTGGTTTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG
008	31	CGGTGATGACGGTGAAAACC
009	32	CCCTGCAGCAAACCACACACGGCACTTACC
010	33	GGTTTTCACCGTCATCACCG
011	34	GTGTGTGGTTTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTG
012	35	AAAAGCTCGAAACCACACACGGCACTTACC
013	36	GTGTGTGGTTGTTAGGCCAGCTTGGCAC
014	37	CTGGCCTAACAACCACACACGGCACTTACC
015	38	GTGTGTGGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTG
016	39	TTGAGAATGAAACCACACACGGCACTTACC
017	40	GTGTGTGGTTTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGG
018	41	CTTTGAACCAAACCACACACGGCACTTACC
019	42	CCGGAATTCTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA ATCAATTACGG
020	43	CGCGGATCCCTGTGTTCTGGCGGCAAAC
021	44	CGCGGATCCCGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAG
022	45	TGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTG
023	46	CCCAAGCTTGGATCCTCACGACACCTGAAATG
024	47	CCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA
		CAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA GGATCCA
025	48	AGCTTGGATCCTCACGACACCTGAAATGGAAGAAAAAAC TTTGAACCACTGTCTGAGGCTTGAGAATGAACCAAGATCC AAACTCAAAAAGG
026	49	CGGGGTACCTTCGCAACGGGTTTGCCG
027	50	CGCGGATCCTCACGACACCTG
028	51	TGAGGATCCGCCACCATGGAGTTTGG
029	52	CGCAAGCTTCAGTAGCGCTTTAGCCAGGAGACAAGCTCAG AGACTTCTG
030	53	GGAACCCCTAGTGATGGAGTT
031	54	CGGCCTCAGTGAGCGA
032	55	FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-BHQ1

Олигонуклеотидные последовательности, используемые в настоящем изобретении.

Результаты эксперимента

1. Повышение экспрессии eGFP интроном EF-1 α в комбинации с промотором EF-1 α .

Был проведен эксперимент по проверке влияния интрона человеческого фактора элонгации-1 альфа (EF-1 α) на экспрессию eGFP, регулируемую комбинацией энхансера цитомегаловируса (CMV) и промотора EF-1 α . Сначала проводили сравнение в экспрессионных конструкциях клеток животных, лишенных ITR. В результате было обнаружено, что уровни экспрессии eGFP во всех используемых клеточных линиях (HEK293, HeLa, ARPE-19, RPE-1, Huh-7 и Hep3B) повышены (459,6%, 276,3%, 181,8%, 163,4%, 471,1%, и 494,3%) посредством интрона EF-1 α (Фиг.2А). Было обнаружено, что уровни экспрессии eGFP в конструкциях рAAV, содержащих ITR, повышены (224,0%, 167,7%, 218,7%, 229,5%, 202,5%, и 260,5%) посредством интрона EF-1 α (Фиг.2В). Эти результаты позволяют предположить, что комбинация интрона EF-1 α с промотором EF-1 α позволяет увеличивать экспрессию генов в различных экспрессионных конструкциях трансгена.

2. Повышение экспрессии eGFP интроном EF-1 α в комбинации с различными промоторами

Проводили испытание, чтобы установить, увеличивает ли интрон EF-1 α экспрессию гена в комбинации с промоторами, отличными от промоторов EF-1 α . В частности, был проведен тест для определения влияния интрона EF-1 α на экспрессию eGFP, индуцированную комбинацией энхансера цитомегаловируса (CMV) и промотора CMV. Сначала было проведено сравнение в экспрессионных конструкциях клеток животных, лишенных ITR. В результате было обнаружено, что уровни экспрессии eGFP во всех используемых клеточных линиях (HEK293, HeLa, ARPE-19, RPE-1, Huh-7 и Hep3B) повышены (284,3%, 464,0%, 217,5%, 180,4%, 405,7%, и 370,6%) интроном EF-1 α (Фиг.3А).

Аналогичным образом, интрон EF-1 α увеличивал экспрессию eGFP, регулируемую комбинацией энхансера цитомегаловируса (CMV) и промотора EF-1 α в ITR-содержащих конструкциях рAAV (241,4%, 494,8%, 266,8%, 185,5%, 415,5%, и 367,8%) (Фиг.3В).

Затем определяли влияние интрона EF-1 α на экспрессию eGFP, регулируемую комбинацией энхансера CMV и промотора куриного β -актина. Сравнение было проведено в экспрессионных конструкциях клеток животных. В результате было обнаружено, что уровни экспрессии eGFP во всех используемых клеточных линиях (HEK293, HeLa, ARPE-

19, RPE-1, Huh-7 и Hep3B) повышены (415.2%, 396.7%, 233.9%, 217.9%, 353.7%, и 297.7%) под действием интрона EF-1 α (Фиг.3С). Эти результаты свидетельствуют о том, что интрон EF-1 α увеличивает экспрессию гена даже в комбинации с промоторами, отличными от промоторов EF-1 α .

3. Определение самого короткого фрагмента интрона EF-1 α , демонстрирующего повышенное влияние на экспрессию гена

3-А. Получение серии конструкций СЕЕ, в которых последовательность интрона EF-1 α была последовательно усечена.

Конструкция СЕЕ-FL была построена таким образом, чтобы включать участки энхансера CMV и промотора CMV (31 п.н. на 5'-конце), промотор EF-1 α , 29 п.н. экзона 1 EF-1 α , 924 п.н. интрона EF-1 α и 9 п.н. экзона 2 EF-1 α . Донор сплайсинга был расположен на 5'-конце коровой последовательности, связанной с функцией сплайсинга интрона, а акцептор сплайсинга, включающий сайт точки ветвления (BPS), был расположен на 3'-конце коровой последовательности. Чтобы найти самую короткую последовательность интрона EF-1 α , обладающую способностью увеличивать экспрессию гена, донорную последовательность сплайсинга на 5'-конце интрона сохраняли, а ниже расположенные нуклеотиды последовательно обрезаали. То есть, были получены конструкции СЕЕ, в которых до 19 п.н. с 5'-конца интрона EF-1 α , которые, как предполагается, являются консенсусной последовательностью донора сплайсинга интрона EF-1 α , присутствовали в общем, и ниже расположенные 659 п.н. (T2), 720 п.н. (T3), 807 п.н. (T3.1), 829 п.н. (T3.1.1), 851 п.н.(T3.1.2), 873 п.н. (T3.2) и 895 п.н. (T4) были усечены, как в Примере 2-1 (Фиг.4А).

3-В. Повышающее или понижающее влияние последовательного усечения нуклеотидов в последовательности интрона EF-1 α на экспрессию гена

Экспрессию eGFP в восьми конструкциях, т.е. конструкции, включающей полноразмерную последовательность интронов EF-1 α (СЕЕ-FL), и конструкциях, включающих последовательно усеченные последовательности интронов EF-1 α , сравнивали в пяти линиях клеток животных. Сначала экспрессию eGFP в последовательно усеченных конструкциях в клеточных линиях HeLa, Hep3B и Huh-7 сравнивали с экспрессией конструкции, содержащей полноразмерный интрон EF-1 α А. В результате экспрессия eGFP сохранялась в СЕЕ-T2 до СЕЕ-T3.1.2, но была резко снижена в СЕЕ-T3.2 и СЕЕ-T4. В клеточных линиях ARPE-19 и RPE-1 экспрессия eGFP в СЕЕ-T2 была снижена на ~50% по сравнению с таковой в СЕЕ-FL, но экспрессии eGFP в СЕЕ-T3-СЕЕ-T3.1.2 были аналогичны или немного выше, чем в СЕЕ-FL. Как и в предыдущих клеточных линиях, экспрессия генов в СЕЕ-T3.2 и СЕЕ-T4 была резко снижена.

Приведенные выше результаты предполагают, что фрагменты от Т2 до Т3.1.2 интрона EF-1 α выполняют функцию увеличения экспрессии гена, и самый короткий из этих фрагментов - Т3.1.2 (но длиннее, чем Т3.2) (Фиг.4В).

4. Повышение экспрессии гена под действием фрагментов интрона EF-1 α Т3.1.1 и Т3.1.2

4-А. Конструирование фрагментов интрона EF-1 α Т3.1.1 и Т3.1.2 в комбинации с промотором куриного β -актина

Конструкция CAE-FL была разработана таким образом, чтобы включать энхансер CMV, промотор куриного β -актина, 32 п.н. экзона 1 куриного β -актина, 29 п.н. экзона 1 EF-1 α , 924 п.н. интрона А EF-1 α и 9 п.н. экзона 2 EF-1 α . СА относится к конструкции, в которой все нуклеотиды интрона EF-1 α были усечены. Конструкция CAE-Т3.1.1 была такой же, как конструкция CAE-FL, за исключением того, что последовательность 19 п.н. и последовательность Т3.1.1 присутствовали на 5' и 3' концах интрона EF-1 α , соответственно, и 829 п.н. между 5' и 3' концами были усечены в конструкции CAE-Т3.1.1. Конструкция CAE-Т3.1.2 была такой же, как конструкция CAE-FL, за исключением того, что последовательность 19 п.н. и последовательность Т3.1.2 присутствовали на 5' и 3' концах интрона EF-1 α , соответственно, а 851 п.н. между 5' и 3' концами были усечены в конструкции CAE-Т3.1.1 (Фиг.5А).

4-В. Повышение экспрессии гена фрагментами интрона EF-1 α Т3.1.1 и Т3.1.2 в комбинации с промотором куриного β -актина

Экспрессию eGFP в СА, где все нуклеотиды интрона EF-1 α были усечены, и CAE-Т3.1.1 и CAE-Т3.1.2, в которых нуклеотиды интрона EF-1 α были частично усечены, сравнивали в двух линиях клеток животных (HeLa, ARPE-19). Экспрессия eGFP в конструкциях CAE-Т3.1.1 и CAE-Т3.1.2 была увеличена на 330,5% и 243,9% в HeLa и на 170,8% и 165,9% в ARPE-19, по сравнению с таковыми в конструкции СА (Фиг.5В). Эти результаты позволяют предположить, что фрагменты Т3.1.1 и Т3.1.2 интрона EF-1 α позволяют увеличивать экспрессию гена даже в комбинации с промотором куриного β -актина.

4-С. Получение конструкций, включающих фрагменты интрона EF-1 α Т3.1.1 и Т3.1.2 в комбинации с донором сплайсинга куриного β -актина

Конструкции СА-Т3.1.1 и СА-Т3.1.2 были построены так, чтобы иметь гибридные интронные структуры, включающие 95 п.н. (Т3.1.1) или 73 п.н. фрагмента (Т3.1.2) на 3' конце интрона EF-1 α и 9 п.н. экзона 2 EF-1 α в состоянии, в котором поддерживались энхансер CMV, промотор куриного β -актина, 93 п.н. экзона 1 куриного β -актина и 43 п.н. интрона куриного β -актина. Было установлено, что части экзона 1 куриного β -актина и

интрона куриного β -актина служат донорами сплайсинга. Было установлено, что фрагменты интрона A EF-1 α служат рецепторами сплайсинга. В качестве контроля была подготовлена и протестирована конструкция CA без интронной последовательности (Фиг.5C).

4-D. Повышение экспрессии гена посредством интрона, гибридного с фрагментом донора сплайсинга куриного β -актина и фрагментами T3.1.1 и T3.1.2 на 3'-конце интрона A EF-1 α

После трансдукции конструкций CA, CA-T3.1.1 и CA-T3.1.2 в клеточные линии HeLa и Hep3B сравнивали уровни экспрессии генов. В результате экспрессия генов в CA-T3.1.1 и CA-T3.1.2 была увеличена (HeLa: 215,7%, 211,0%, Hep3B: 155,0%, 167,5%) по сравнению с экспрессией генов в CA без интронов. Эти результаты позволяют предположить, что интронные фрагменты EF-1 α T3.1.1 и T3.1.2 могут увеличивать экспрессию генов даже в комбинации с донорами сплайсинга других генов (Фиг.5D).

5. Повышение экспрессии генов фрагментами T3.1.1 и T3.1.2 при доставке генов с использованием AAV

5-A. Повышение экспрессии генов фрагментами T3.1.1 и T3.1.2 при доставке генов in vitro с использованием AAV2

Чтобы определить, обладали ли фрагменты T3.1.1 и T3.1.2 интрона EF-1 α способностью эффективно индуцировать экспрессию генов, когда AAV использовали для доставки генов, экспрессию генов в конструкциях AAV2, включающих фрагменты CA-T3.1.1, CA-T3.1.2, CAE-T3.1.1 и CAE-T3.1.2 сравнивали с таковыми в конструкциях AAV2, включающих CAG-FL и CAE-FL в качестве регуляторных сайтов для экспрессии генов. Конструкции AAV2 были сконструированы для экспрессии внеклеточного секреторного белка афлиберцепта (в качестве последовательности сигнального пептида использовали нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26, кодирующую сигнальный пептид hIgG). Обработанную MG132 клеточную линию HEK293 инфицировали AAV2 при MOI 25000. Через 48 часов после заражения концентрацию афлиберцепта в растворе для культивирования клеток определяли методом ELISA. В результате экспрессия афлиберцепта была увеличена на 200,1% и 213,1% при заражении CA-T3.1.1 и CA-T3.1.2 в качестве конструкций AAV2, соответственно, по сравнению с заражением CAG-FL. Кроме того, экспрессия афлиберцепта в CAE-T3.1.1 и CAE-T3.1.2 в качестве конструкций AAV2 была увеличена на 118,2% и 166,5%, соответственно, по сравнению с экспрессией в CAG-FL (Фиг.6A). Приведенные выше результаты позволяют предположить, что фрагменты интрона A EF-1 α T3.1.1 и T3.1.2 могут эффективно увеличивать экспрессию генов, когда AAV2 используют для доставки генов, аналогично

тому, когда для доставки генов используют плазмидную ДНК.

5-B. Повышение экспрессии генов фрагментами T3.1.1 и T3.1.2 при доставке генов in vivo с использованием AAV8

Чтобы определить, обладал ли фрагмент T3.1.1 интрона EF-1 α способностью эффективно индуцировать экспрессию гена, когда AAV использовали для доставки генов in vivo, экспрессии генов в конструкциях AAV8, включая фрагменты CA-T3.1.1 и CAE-T3.1.12, сравнивали с теми, что содержатся в конструкциях AAV8, включающих CAG-FL и CAE-FL в качестве регуляторных сайтов для экспрессии генов. Конструкции AAV8 были разработаны для экспрессии внеклеточного секреторного белка афлиберцепта (в качестве последовательности сигнального пептида использовали нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26, кодирующую сигнальный пептид hIgG). 1×10^9 мкг каждой конструкции AAV8 вводили субретинально в оба глаза 8 мышей в каждой группе. Через 28 дней после инъекции экспрессию афлиберцепта в каждом глазу определяли методом ELISA. В результате экспрессия афлиберцепта в группе, получавшей CAE-T3.1.1, была увеличена на 147,6% по сравнению с экспрессией в группе CAE-FL. Экспрессия афлиберцепта в группе, получавшей CA-T3.1.1, была увеличена на 118,7% по сравнению с экспрессией в группе CAG-FL (Фиг.6B). Эти результаты позволяют предположить, что интронный фрагмент EF-1 α T3.1.1 может эффективно индуцировать экспрессию гена даже in vivo.

Фигура 6C представляет собой карту расщепления вектора pAAV-CA-T3.1.1, в который был введен афлиберцепт в качестве трансгена.

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, цитируемые в данной заявке, настоящим включаются посредством ссылки во всей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или другой документ были индивидуально указаны для включения посредством ссылки для всех целей.

Хотя настоящее изобретение было описано здесь со ссылкой на вышеупомянутые аспекты, специалисты в данной области техники оценят, что возможны различные изменения и модификации путем добавления, модификации, удаления или вставки элементов без отступления от сущности настоящего изобретения, как раскрыто в сопроводительной формуле изобретения. Следует понимать, что такие изменения и модификации входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный полинуклеотид, включающий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 874-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

2. Полинуклеотид по п.1, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57.

3. Полинуклеотид по п.1, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 57.

4. Изолированный полинуклеотид, включающий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 852-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

5. Полинуклеотид по п.4, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность включает нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3.

6. Полинуклеотид по п.4, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3.

7. Изолированный полинуклеотид, включающий нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере

примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидами 830-924 из SEQ ID NO: 1, где нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность не содержит SEQ ID NO: 1.

8. Полинуклеотид по п.7, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2.

9. Полинуклеотид по п.7, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность состоит из последовательности нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 2.

10. Полинуклеотид по любому из пп.1-9, который содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 5'-конце («5'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

11. Полинуклеотид по п.10, который содержит один или несколько смежных или несмежных нуклеотидов, соответствующих положениям 1-873 в SEQ ID NO: 1 в 5'-области нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

12. Полинуклеотид по любому из пп.1-11, который содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере пять, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90 или по меньшей мере примерно 100 дополнительных нуклеотидов на 3'-конце («3'-области») нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

13. Полинуклеотид по любому из пп.1-12, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности (i) с нуклеотидами 871-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 58); (ii) с нуклеотидами 861-924 из SEQ ID NO:

1 (т.е. SEQ ID NO: 59); (iii) с нуклеотидами 852-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 60); (iv) с нуклеотидами 851-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 61); (v) с нуклеотидами 830-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 2); (vi) с нуклеотидами 821-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 63); (vii) с нуклеотидами 811-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 64); (viii) с нуклеотидами 808-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 65); (ix) с нуклеотидами 801-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 66); (x) с нуклеотидами 751-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 67); (xi) с нуклеотидами 721-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 68); (xii) с нуклеотидами 701-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 69); (xiii) с нуклеотидами 651-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 70); (xiv) с нуклеотидами 601-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 71); (xv) с нуклеотидами 570-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 72); (xv) с нуклеотидами 551-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 73) или (xvi) с нуклеотидами 501-924 из SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 74).

14. Полинуклеотид по любому из пп.1-13, который дополнительно содержит трансген.

15. Полинуклеотид по п.14, в котором трансген способен транслироваться в полипептид.

16. Полинуклеотид по п.15, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность способна увеличивать экспрессию трансгена при трансляции по сравнению с эталонной экспрессией, где эталонная экспрессия включает экспрессию соответствующего трансгена при трансляции при отсутствии нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности и/или в присутствии трансгена, содержащего нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

17. Полинуклеотид по п.16, в котором нетранслируемая нуклеиновокислотная последовательность способна увеличивать экспрессию трансгена по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере, примерно в 7 раз, по меньшей мере, примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз или по меньшей мере примерно в 10 раз по сравнению с эталонной экспрессией.

18. Полинуклеотид по любому из пп.1-17, который дополнительно содержит

промотор.

19. Полинуклеотид по п.18, в котором промотор включает промотор цитомегаловируса (CMV), промотор EF-1 α , промотор β -актина, промотор GAPDH, промотор HSP70, промотор GRP78, промотор eIF4A, промотор AAT, промотор TTR, промотор GFAP, промотор SV40, промотор SYN1, промотор GRK, промотор Rho или любую их комбинацию.

20. Полинуклеотид по п.19, в котором промотором является промотор EF-1 α .

21. Полинуклеотид по п.20, в котором промотор EF-1 α содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 7.

22. Полинуклеотид по п.19, в котором промотор включает промотор CMV.

23. Полинуклеотид по п.22, в котором промотор CMV включает последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 5 или 6.

24. Полинуклеотид по п.19, в котором промотор включает промотор β -актина.

25. Полинуклеотид по п.24, в котором промотор β -актина включает последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 8.

26. Полинуклеотид по любому из пп.1-25, который дополнительно содержит энхансер.

27. Полинуклеотид по п.26, в котором энхансер включает энхансер цитомегаловируса (CMV), ранний энхансер SV40, энхансер аденовируса 5 E1A, регуляторную область энхансера-1 (Eh-1) HBV, длинную контрольную область (LCR)

HPV-16 или -18 E6/7, длинный терминальный повтор (LTR) HIV-1 или любую их комбинацию.

28. Полинуклеотид по п.27, в котором энхансер CMV содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4.

29. Полинуклеотид по любому из пп.1-28, который дополнительно содержит донорную последовательность сплайсинга.

30. Полинуклеотид по п.29, в котором донорная последовательность сплайсинга связана выше от нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности.

31. Полинуклеотид по пп.29 или 30, в котором донорная последовательность сплайсинга содержит последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 9 или 10.

32. Полинуклеотид по любому из пп.1-31, который дополнительно содержит нуклеотидную последовательность экзона 2 (E2) EF-1 α .

33. Полинуклеотид по п.32, в котором нуклеотидная последовательность экзона 2 (E2) EF-1 α имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 11.

34. Полинуклеотид по любому из пп.1-33, который дополнительно содержит последовательность экзона 1 (E1) цитомегаловируса (CMV), последовательность E1 EF-1 α , последовательность E1 β -актина или любую их комбинацию.

35. Полинуклеотид по п.34, в котором последовательность E1 CMV содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по

меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 12.

36. Полинуклеотид по п.34, в котором последовательность E1 EF-1 α содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 13.

37. Полинуклеотид по п.34, в котором последовательность E1 β -актина содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 14 или 15.

38. Полинуклеотид по любому из пп.1-37, который дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность-мишень для микроРНК (miRNA), специфичную для иммунной клетки.

39. Полинуклеотид по п.38, в котором микроРНК включает miR142-3p, miR142-5p или обе из них.

40. Полинуклеотид по п.38 или 39, в котором последовательность-мишень для микроРНК включает антисмысловой олигонуклеотид, антагонист, молекулу короткой шпилечной РНК (кшРНК), молекулу малой интерферирующей РНК (миРНК), рибозим, олигонуклеотид пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), олигонуклеотид заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA), или любую их комбинацию.

41. Полинуклеотид по п.41, в котором последовательность-мишень для микроРНК комплементарна полноразмерной или частичной последовательности miR142-3p или miR142-5p.

42. Полинуклеотид по любому из пп.38-41, в котором последовательность-мишень для микроРНК содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17.

43. Полинуклеотид по любому из пп.38-42, который содержит по меньшей мере две последовательности-мишени, по меньшей мере три последовательности-мишени, по меньшей мере четыре последовательности-мишени, по меньшей мере пять

последовательностей-мишеней, по меньшей мере шесть последовательностей-мишеней, по меньшей мере семь последовательностей-мишеней, по меньшей мере восемь последовательностей-мишеней, по меньшей мере девять последовательностей-мишеней, или по меньшей мере десять последовательностей-мишеней.

44. Полинуклеотид по п.43, в котором две или более последовательностей-мишеней являются одинаковыми.

45. Полинуклеотид по п.43, в котором каждая из последовательностей-мишеней отличается.

46. Полинуклеотид по любому из пп.1-45, который дополнительно содержит последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WPRE).

47. Полинуклеотид по п.46, в котором последовательность WPRE содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 18.

48. Полинуклеотид по любому из пп.1-47, который дополнительно содержит одну или несколько последовательностей полиаденилирования (pA).

49. Полинуклеотид по п.48, в котором последовательность pA содержит по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 19-22.

50. Полинуклеотид по любому из пп.14-49, в котором трансген кодирует полипептид дикого типа или любой его вариант, гибридный белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, молекулу на основе РНК или любую их комбинацию.

51. Полинуклеотид по п.50, в котором трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью,

указанной в SEQ ID NO: 23.

52. Полинуклеотид по п.50 или п.51, в котором трансген кодирует гибридный белок.

53. Полинуклеотид по любому из пп.50-52, в котором гибридный белок включает ингибитор фактора роста эндотелия сосудов («VEGF»).

54. Полинуклеотид по п.53, в котором ингибитор VEGF включает афлиберцепт.

55. Полинуклеотид по п.50, в котором молекула на основе РНК включает микроРНК, кшРНК, миРНК, рибозим или любую их комбинацию.

56. Полинуклеотид по любому из пп.1-55, который представляет собой рекомбинантную экспрессионную конструкцию.

57. Полинуклеотид, содержащий (i) трансген и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансер CMV, указанный в SEQ ID NO: 4; (2) промотор, выбранный из промоторной последовательности CMV, указанной в SEQ ID NO: 5 или 6, промоторной последовательности EF-1, указанной в SEQ ID NO: 7, или промоторной последовательности куриного β -актина, указанной в SEQ ID NO: 8; (3) последовательность экзона 1 (E1), выбранную из последовательности E1 CMV, указанной в SEQ ID NO: 12, последовательности E1 EF-1 α , указанной в SEQ ID NO: 13, или последовательности E1 куриного β -актина, указанной в SEQ ID NO: 14 или 15; (4) донорную последовательность сплайсинга, указанную в SEQ ID NO: 9 или 10; (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2

(TGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCC TCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAG), SEQ ID NO:3 (CTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTT CTTCCATTTTCAG), или SEQ ID NO:57 (TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAG); и (6) последовательность E2 EF-1 α , указанную в SEQ ID NO: 11.

58. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.1-57.

59. Вектор по п.58, который является вирусным вектором.

60. Вектор по п.59, где вирусный вектор включает аденовирус (например, генно-инженерный аденовирус), аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус, вирус типа SV40, полиомавирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус папилломы, вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины, вирус полиомиелита, бакуловирус, ретровирус, поксвирус или любую их комбинацию.

61. Вектор по п.60, где вирусным вектором является AAV.
62. Вектор по любому из пп.58-61, который предназначен для использования в генной терапии.
63. Вектор по любому из пп.58-62, который предназначен для использования при экспрессии полипептида, кодируемого трансгеном.
64. Вектор по любому из пп.58-63, в котором трансген содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.
65. Клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-57 или вектор по любому из пп.58-64.
66. Способ получения рекомбинантной вирусной частицы, включающий трансдукцию клетки вектором по любому из пп.58-64 и конструкцией, содержащей гены гер и сар.
67. Способ по п.66, дополнительно включающий изоляцию полученной рекомбинантной вирусной частицы.
68. Рекомбинантная вирусная частица, полученная способом по п.66 или п.67.
69. Рекомбинантная вирусная частица, содержащая (а) капсидный белок и (b) вектор по любому из пп.58-64.
70. Рекомбинантная вирусная частица по п.69, которая представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).
71. Рекомбинантная вирусная частица по п.70, в которой серотипом AAV является AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAVrh10.
72. Рекомбинантная вирусная частица по п.71, в которой серотипом AAV является AAV2.
73. Рекомбинантная вирусная частица по п.71, в которой серотипом AAV является AAV8.
74. Рекомбинантная вирусная частица по п.71, в которой серотипом AAV является AAV5.
75. Рекомбинантная вирусная частица по п.71, в которой серотипом AAV является AAV9.
76. Фармацевтическая композиция, включающая (а) полинуклеотид по любому из пп.1-57, вектор по любому из пп.58-64, клетку по п.65 или рекомбинантную вирусную частицу по любому из пп.68-75; и (b) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
77. Фармацевтическая композиция, включающая рекомбинантную аденоассоциированную вирусную частицу и фармацевтически приемлемый носитель, где

рекомбинантная аденоассоциированная вирусная частица содержит (а) капсидный белок AAV типа 8 и (b) полинуклеотид, содержащий (i) трансген, включающий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность цитомегаловируса (CMV), указанную в SEQ ID NO: 4, (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8, (3) последовательность экзона 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15, (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в

	SEQ	ID	NO:2
(TGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCT			
CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCCATTTCAG),	SEQ	ID	NO:3
(CCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT			
TTCTTCCATTTCAG),	или	SEQ	ID
			NO:57
(TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAG),			

и (6) последовательность экзона 2 EF-1 α (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

78. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения офтальмологического заболевания, содержащая рекомбинантную аденоассоциированную вирусную частицу и фармацевтически приемлемый носитель, где рекомбинантная аденоассоциированная вирусная частица содержит (а) капсидный белок AAV типа 8 и (b) полинуклеотид, содержащий (i) трансген, включающий нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и (ii) контрольный элемент, функционально связанный с трансгеном, содержащий (от 5' к 3'): (1) энхансерную последовательность цитомегаловируса (CMV), указанную в SEQ ID NO: 4, (2) промоторную последовательность куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 8, (3) последовательность экзона 1 (E1) куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 15, (4) донорную последовательность сплайсинга интрона куриного β -актина, указанную в SEQ ID NO: 10, (5) нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, содержащую, состоящую по существу или состоящую из нуклеотидной последовательности, указанной в

	SEQ	ID	NO:2
(TGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCT			
CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCCATTTCAG),	SEQ	ID	NO:3
(CCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT			
TTCTTCCATTTCAG),	или	SEQ	ID
			NO:57

(TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAG), и (6) последовательность экзона 2 EF-1 α (E2), указанную в SEQ ID NO: 11.

79. Фармацевтическая композиция для применения по п.78, где офтальмологическое заболевание включает диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, макулярную дегенерацию, дегенерацию сетчатки, макулярный отек, отек сетчатки, отечность желтого пятна или их комбинации.

80. Фармацевтическая композиция для применения по п.79, где макулярная дегенерация включает возрастную макулярную дегенерацию (ВМД).

81. Способ увеличения экспрессии трансгена в клетке, включающий обеспечение контакта клетки с полинуклеотидом по любому из пп.1-57, вектором по любому из пп.58-64 или рекомбинантной вирусной частицей по любому из пп.68-75.

82. Способ по п.81, в котором контакт осуществляют *in vivo*.

83. Способ по п.82, включающий введение полинуклеотида, вектора или рекомбинантной вирусной частицы субъекту перед контактом.

84. Способ по п.81, в котором контакт осуществляют *ex vivo*.

85. Способ по любому из пп.81-84, в котором экспрессия трансгена повышается по меньшей мере примерно в 1 раз, по меньшей мере примерно в 1,1 раза, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, по меньшей мере примерно в 1,3 раза, по меньшей мере примерно в 1,4 раза, по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 1,6 раза, по меньшей мере примерно в 1,7 раза, по меньшей мере примерно в 1,8 раза, по меньшей мере примерно в 1,9 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 3,5 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере, примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, или по меньшей мере примерно в 10 раз или более, по сравнению с соответствующей экспрессией в контрольной клетке, где контрольная клетка контактирует с полинуклеотидом, вектором или рекомбинантной вирусной частицей, либо не содержащими нетранслируемую нуклеиновокислотную последовательность, либо содержащими нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

86. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту полинуклеотида по любому из пп.1-57, вектора по любому из пп.58-64 или рекомбинантной вирусной частицы по любому из пп.68-75.

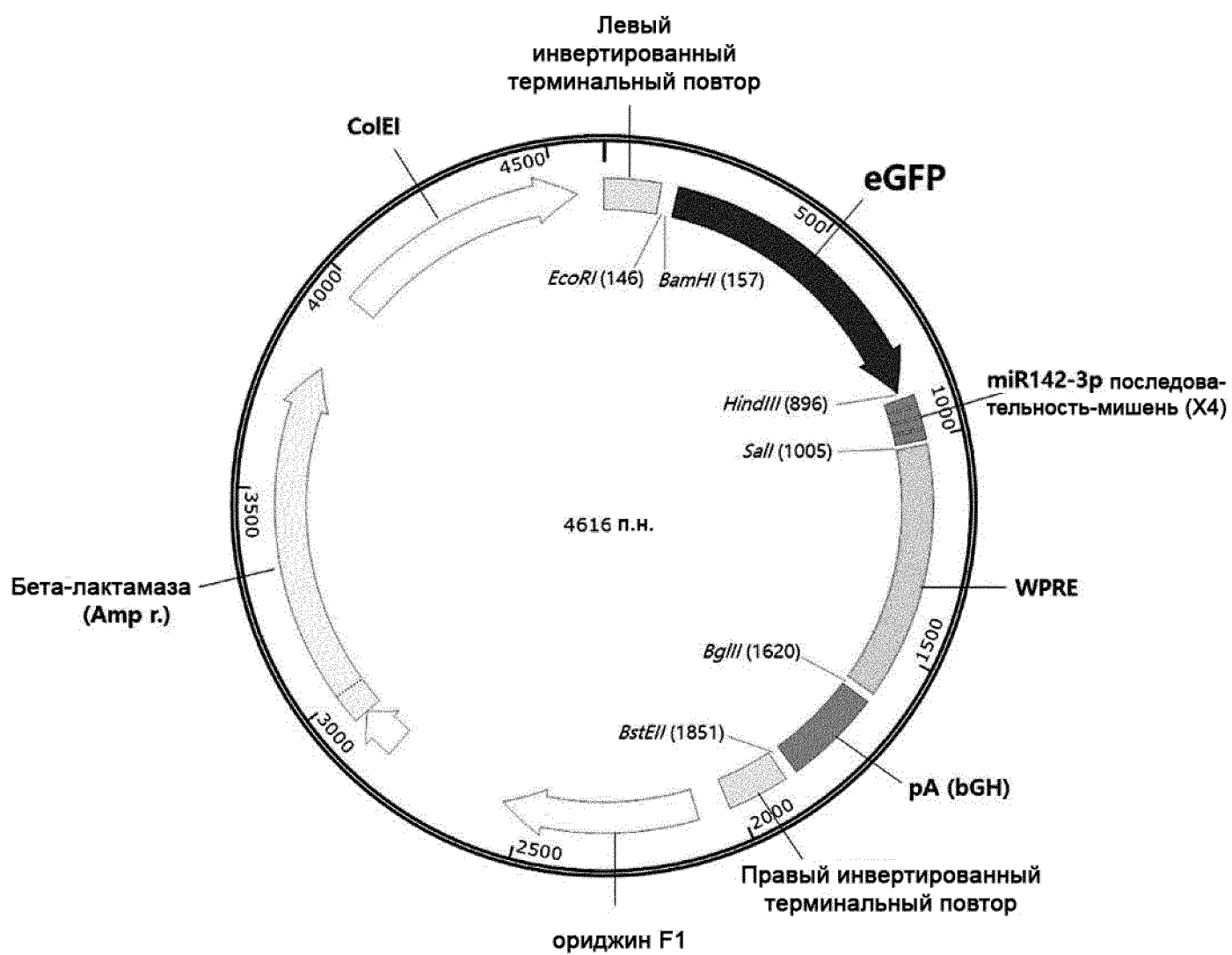
87. Способ по п.86, в котором заболевание или расстройство включает офтальмологическое заболевание.

88. Способ по п.87, в котором офтальмологическое заболевание включает

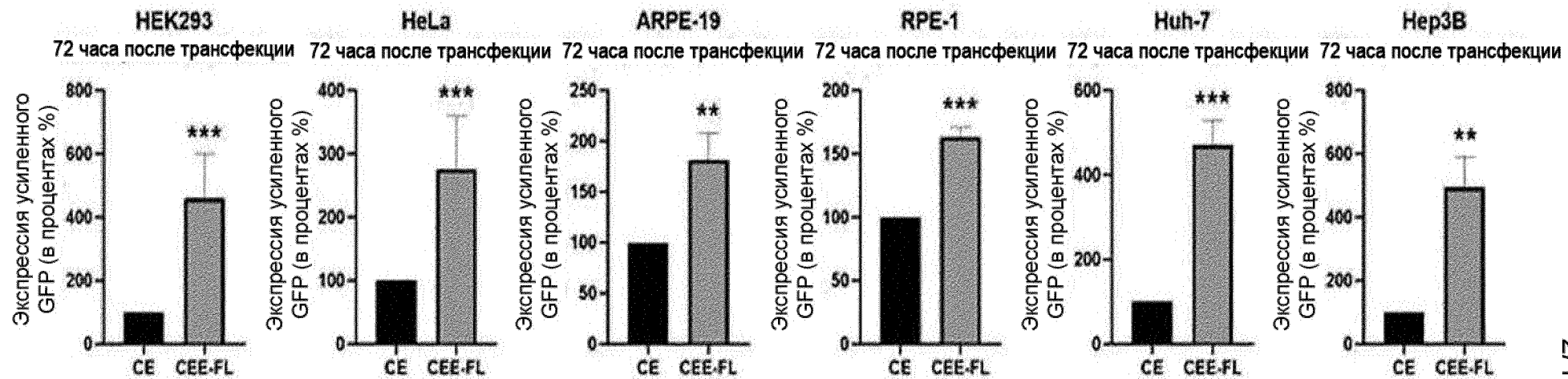
диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, макулярную дегенерацию, дегенерацию сетчатки, макулярный отек, отек сетчатки, отечность желтого пятна или их комбинации.

89. Способ по п.88, в котором макулярная дегенерация включает возрастную макулярную дегенерацию (ВМД).

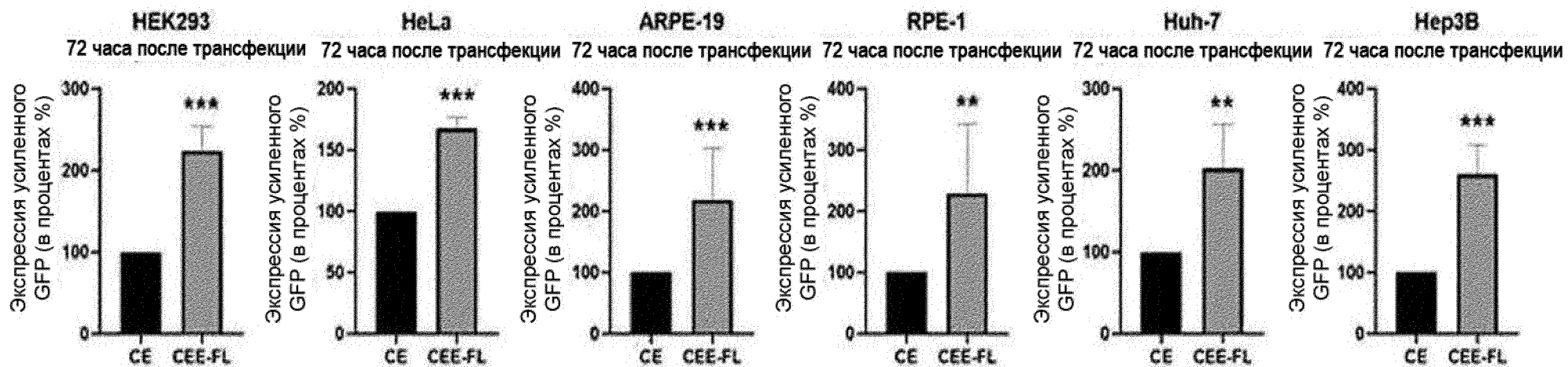
90. Способ по любому из пп.86-89, включающий введение субъекту дополнительного терапевтического агента.



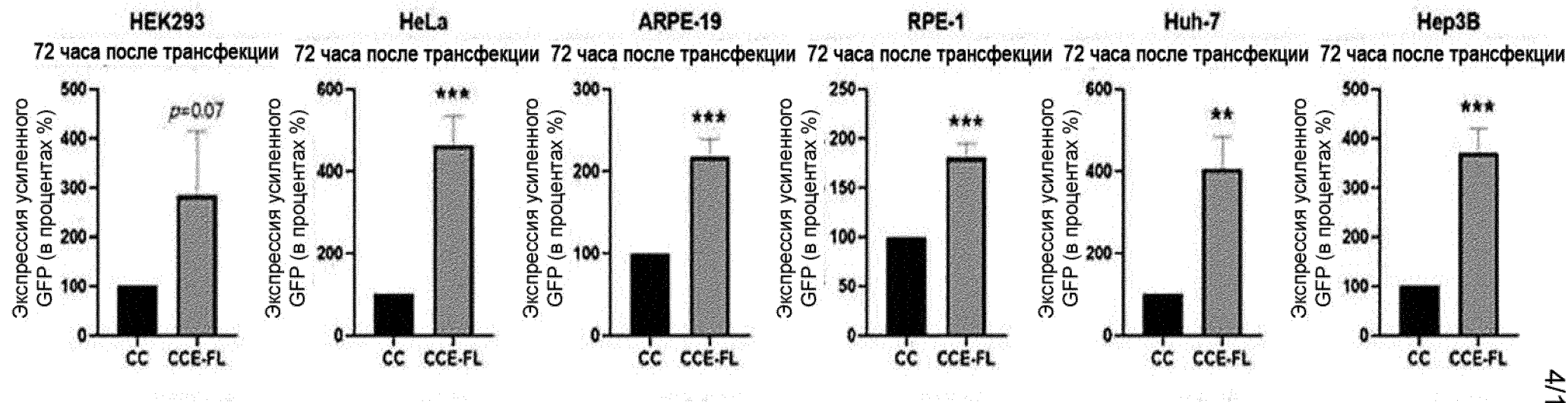
Фиг. 1



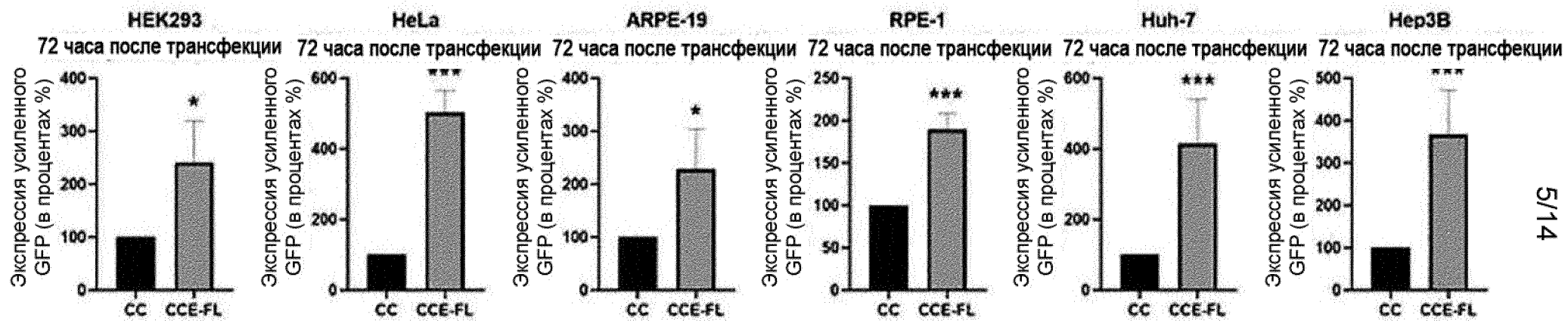
Фиг. 2А



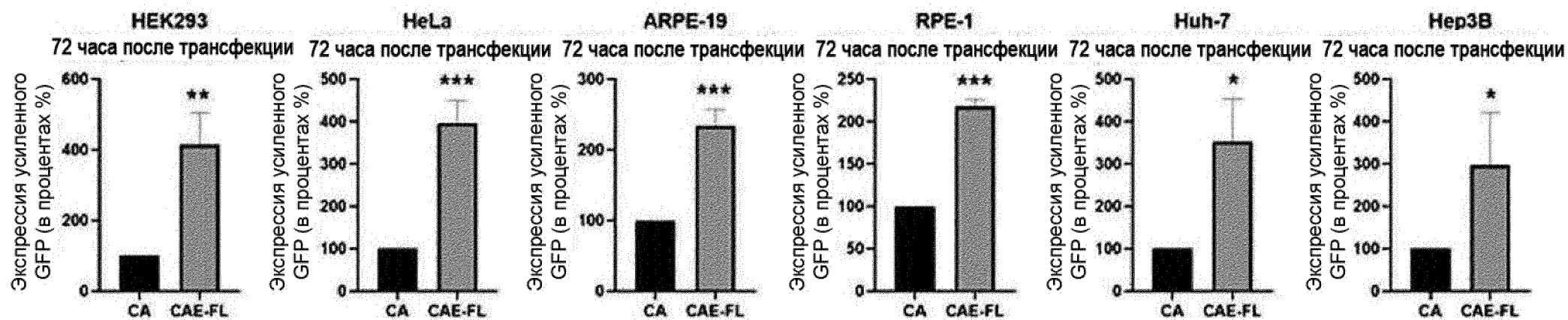
Фиг. 2В



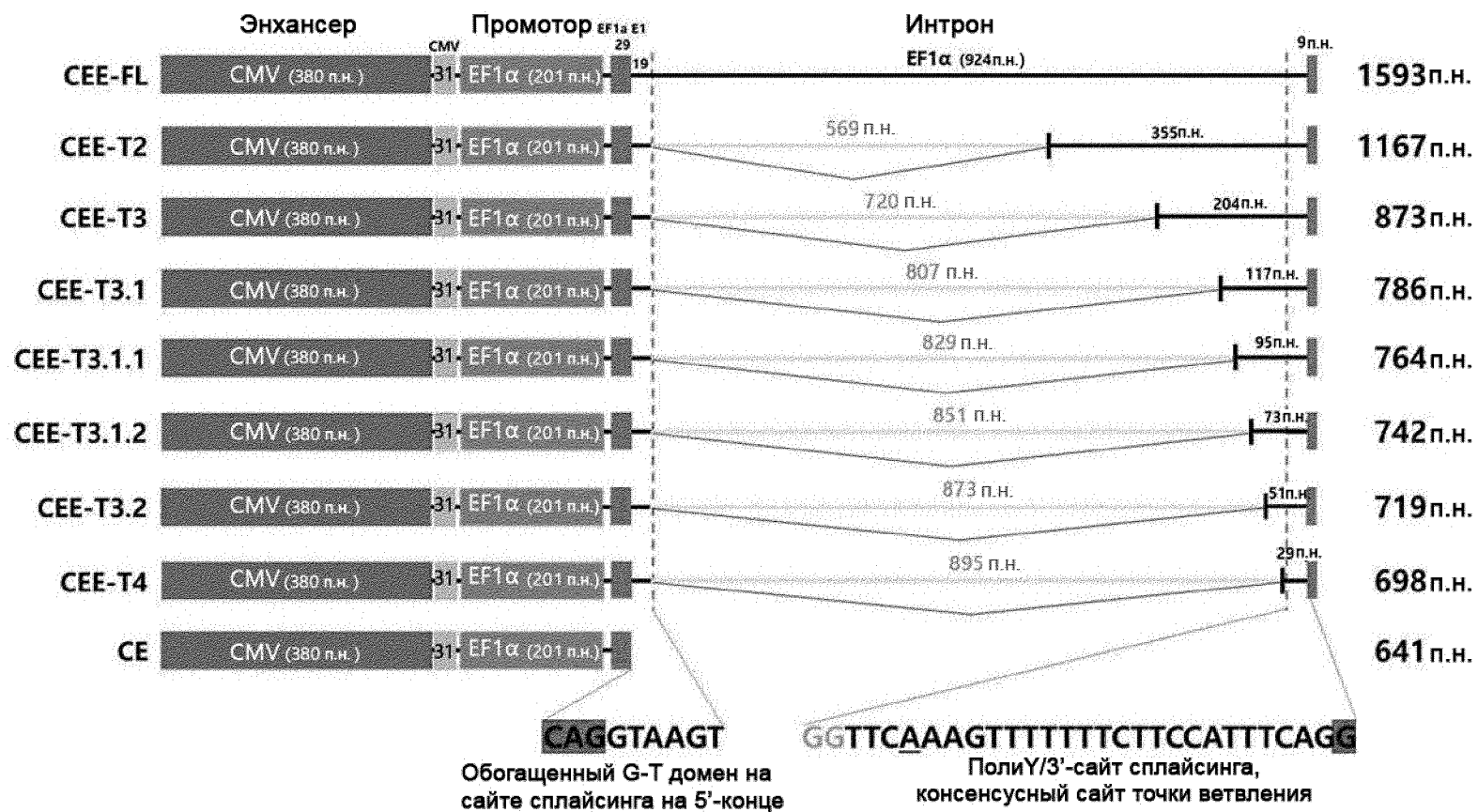
Фиг. 3А



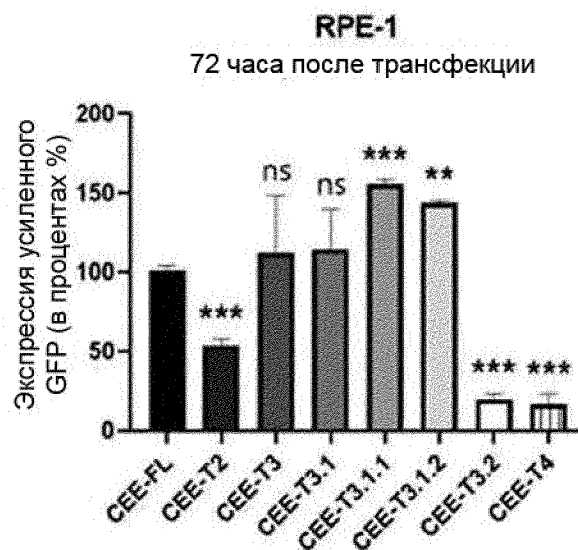
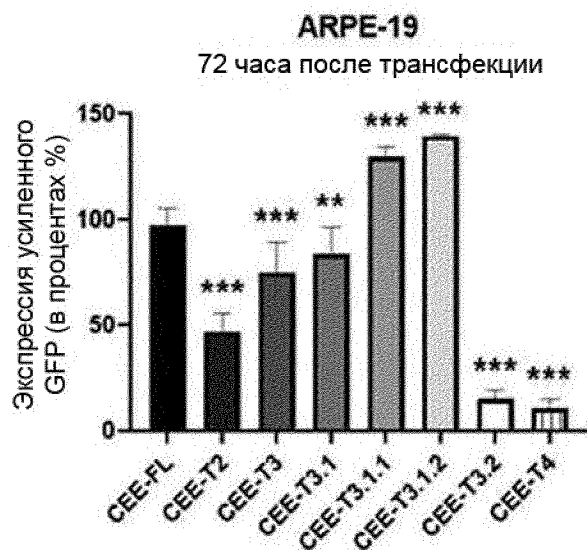
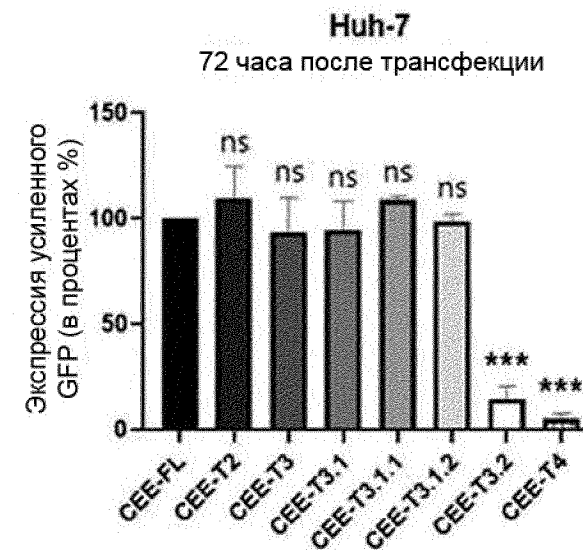
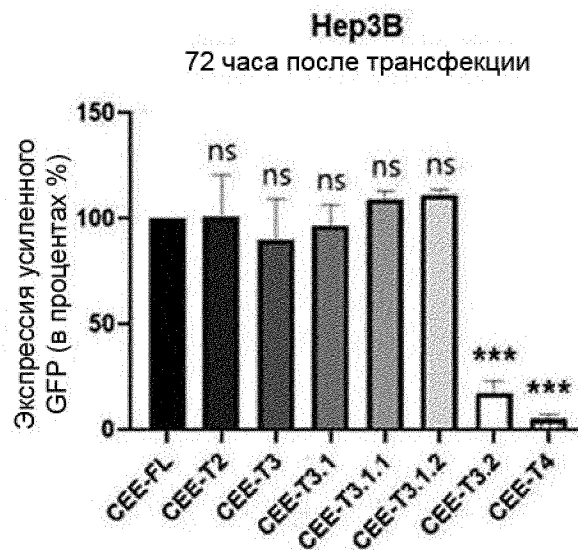
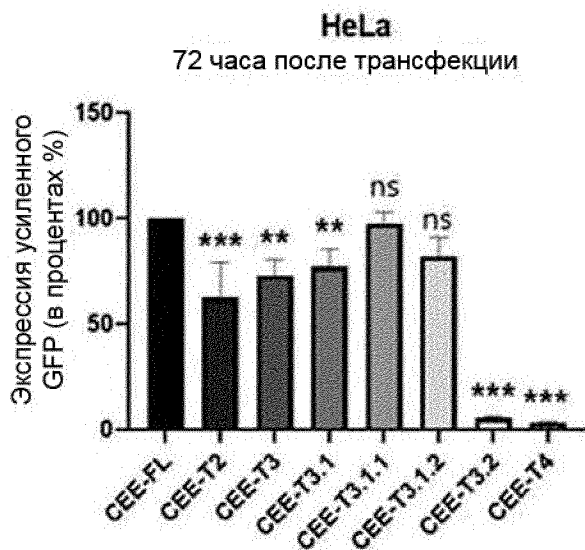
Фиг. 3В



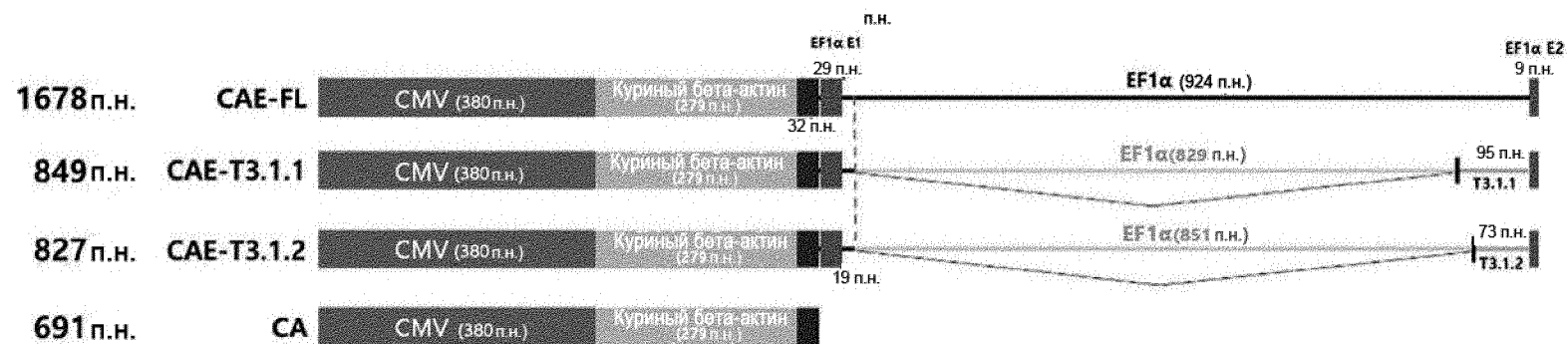
Фиг. 3С



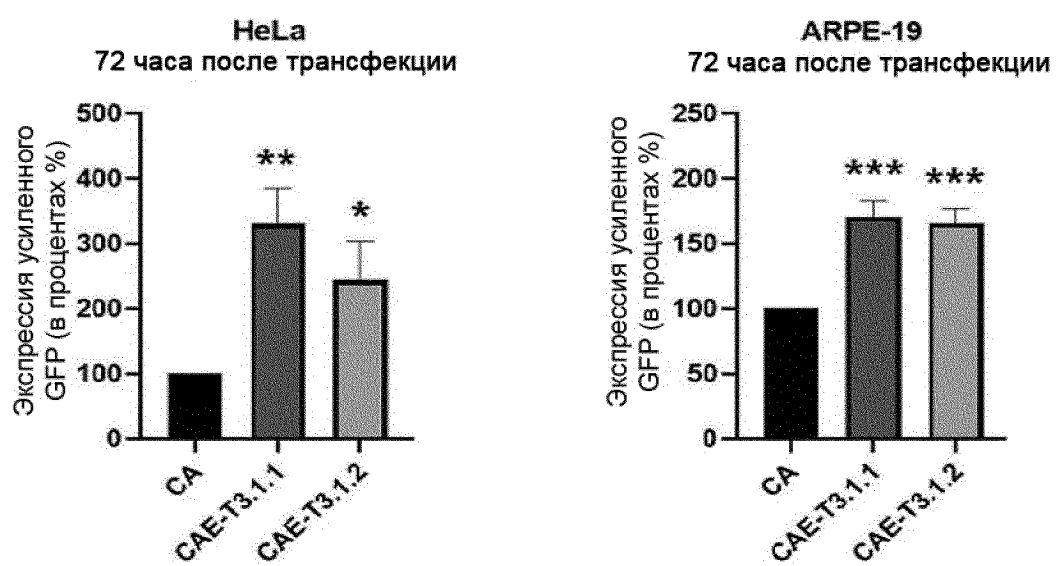
Фиг. 4А



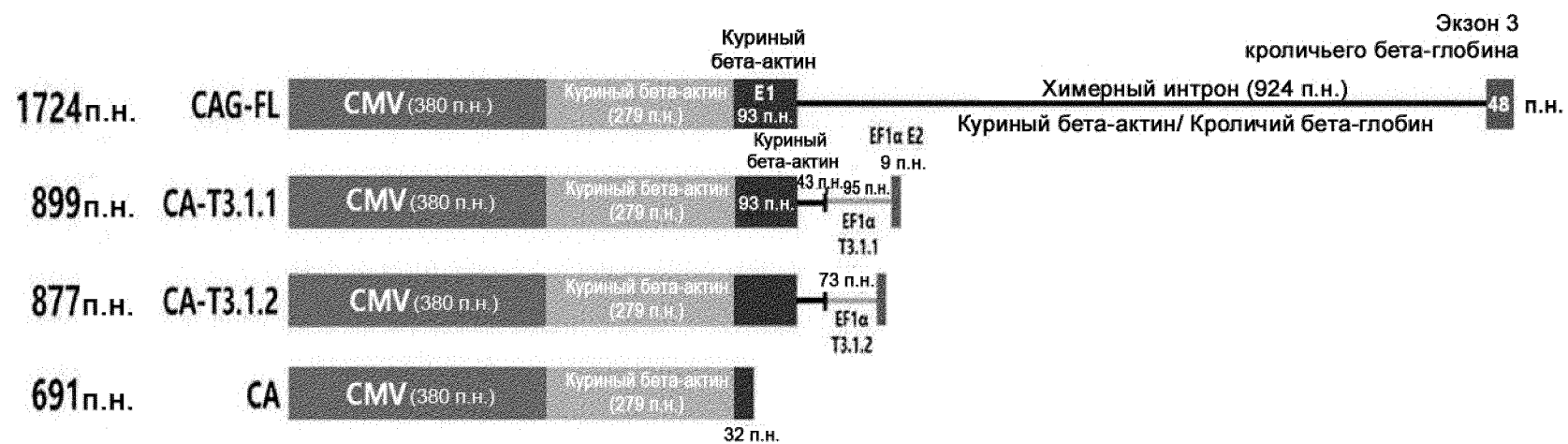
Фиг. 4В



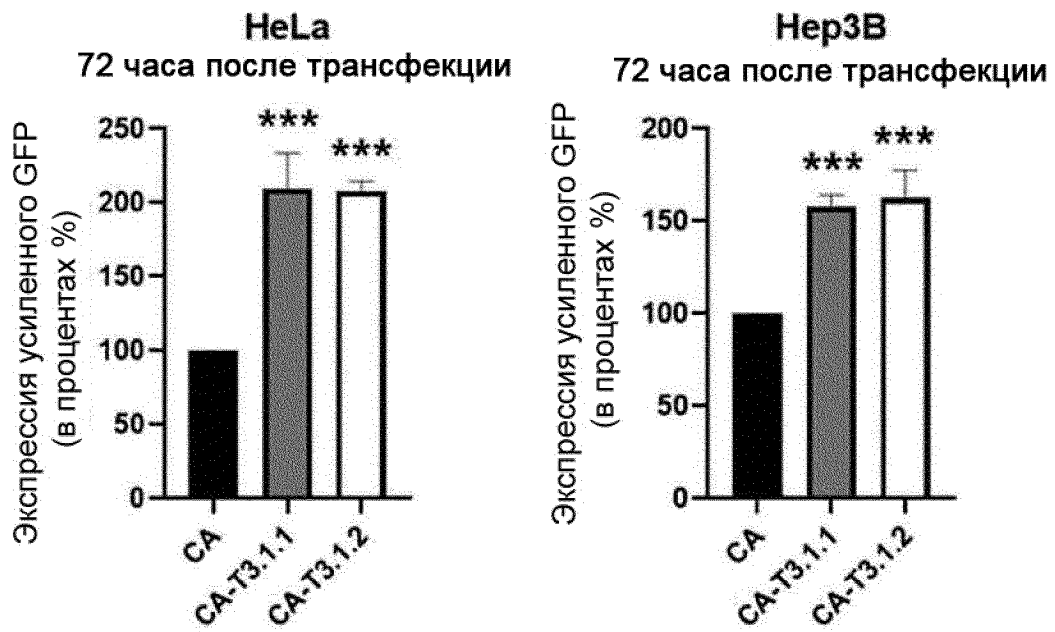
Фиг. 5А



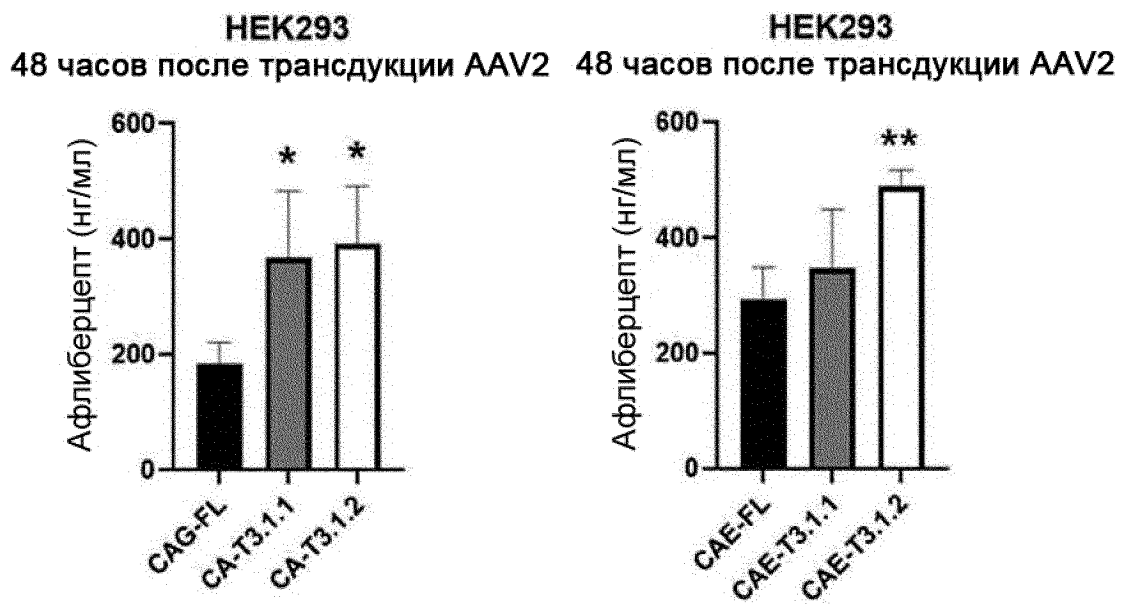
Фиг. 5В



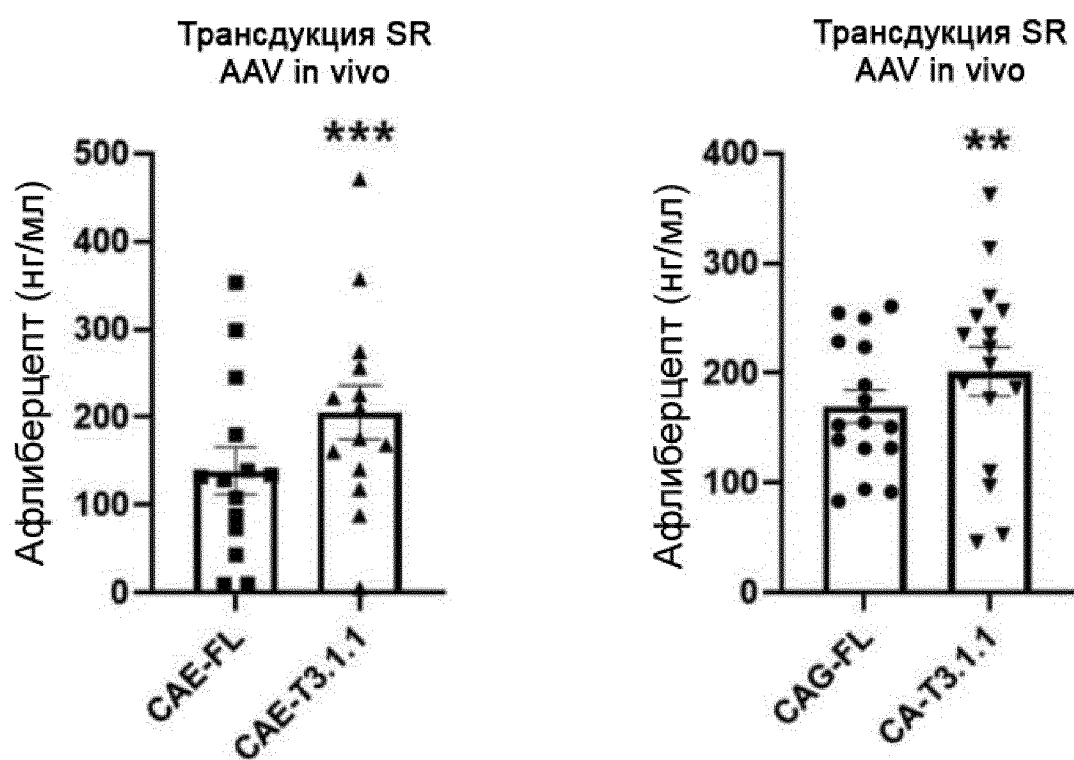
Фиг. 5С



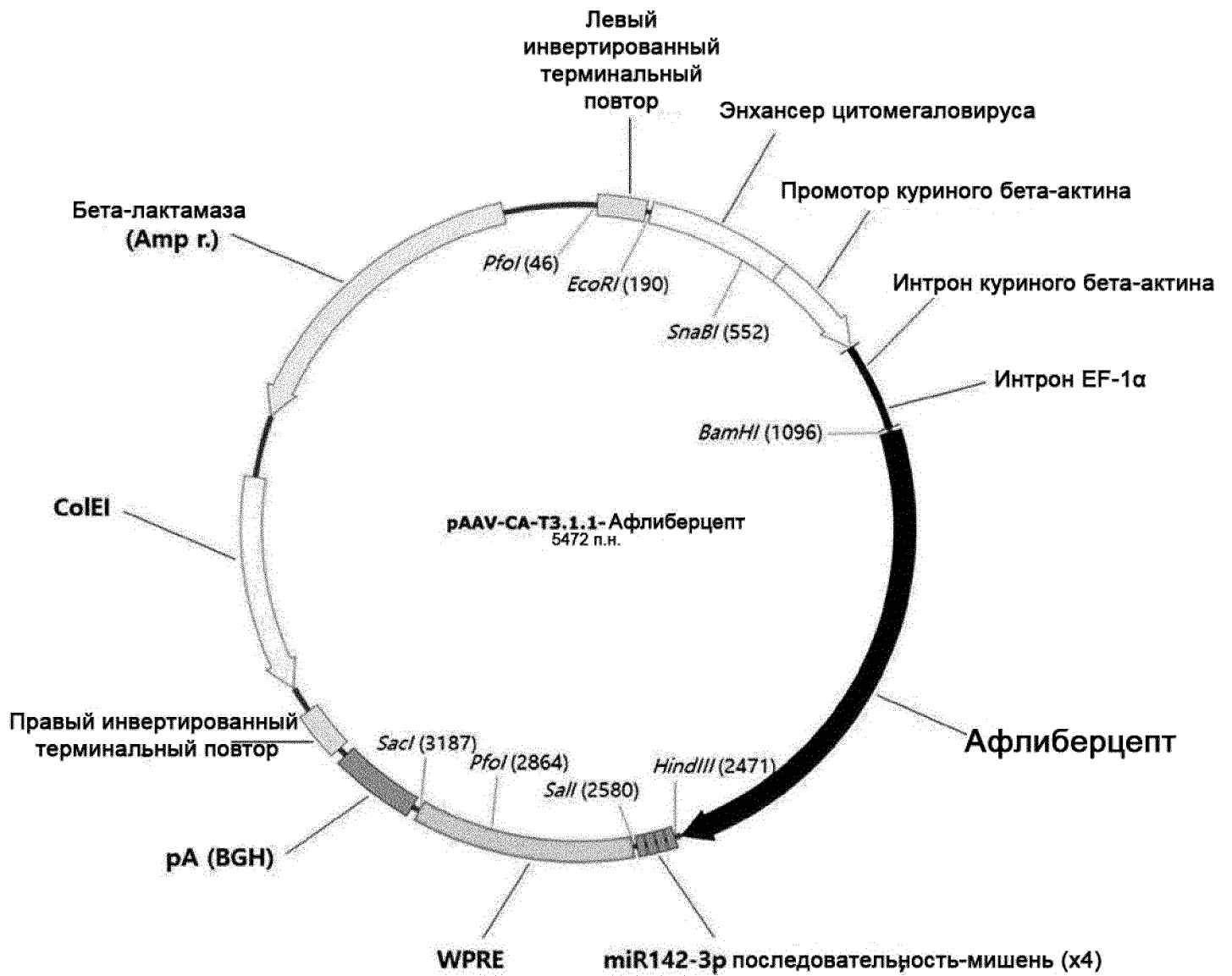
Фиг. 5D



Фиг. 6A



Фиг. 6В



Фиг. 6С