

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390421** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.04.24

(51) Int. Cl. **C12N 7/00 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2021.08.19

(54) **ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
СИНДРОМА РЕТТА**

(31) **63/067,668**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.08.19**

О'Бэнион Колин (US)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2021/046699**

(87) **WO 2022/040432 2022.02.24**

(71) Заявитель:

**САРЕПТА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)**

(57) В настоящем изобретении представлены нуклеиновые кислоты (содержащие кассеты экспрессии на основе AAV), векторы на основе AAV и композиции для применения в способах лечения и/или задержки проявления заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *meis2*, таких как синдром Ретта. Также в данном документе представлены способы лечения и/или задержки проявления заболеваний, ассоциированных с нейротрофическим фактором головного мозга (BDNF).



pTR141-hSARE-ArcMin-BDNF-короткая 3'UTR (AAV2 ITR - AAV2 ITR)
4200 н. о.

202390421

A1

A1

202390421

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА РЕТТА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/067668, поданной 19 августа 2020 года, содержание которой включено в данный документе посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к областям молекулярной биологии и генной терапии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям и способам получения рекомбинантных вирусных векторов.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: Копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (STRD_020_01WO_SeqList_ST25.txt, дата записи: 19 августа 2021 года, размер файла: приблизительно 89555 байт).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Синдром Ретта представляет собой генетическое неврологическое нарушение, проявляющееся в возрасте от приблизительно 6 месяцев до 18 месяцев преимущественно у девочек и женщин. Синдром Ретта поражает приблизительно 1 из 8500 женских особей и является редким заболеванием. Пациенты с синдромом Ретта зачастую демонстрируют широкий спектр симптомов, включая речевые нарушения, снижение координации, микроцефалию, повторяющиеся движения, судороги, сколиоз и когнитивные нарушения. В то время как средняя продолжительность жизни женщин с синдромом Ретта составляет около 40–50 лет, мужские особи с синдромом Ретта зачастую умирают в младенчестве.

[0005] Синдром Ретта вызывается мутациями в гене *mecp2* и коррелирует с дефектами в функции нейрона. Многие случаи синдрома Ретта возникают в результате новых мутаций в гене *mecp2*. Однако в небольшом числе случаев мутации в *mecp2* проявляют X-сцепленный, доминантный характер наследования. Мутации в *mecp2* также вызывают другие заболевания, такие как синдром дупликации MECP2 и синдром RRM-X, и могут быть ассоциированы с нарушением аутистического спектра.

[0006] Не существует известного лечения синдрома Ретта и других ассоциированных с *meCP2* заболеваний. Симптомы синдрома Ретта, как правило, купируют с помощью противосудорожных средств, коррекционного образования, физиотерапии и фиксаторов. Потенциально применимым способом лечения синдрома Ретта является генная терапия. Однако генная терапия, нацеленная на нервную систему, зачастую сталкивается с рядом технических трудностей, включая идентификацию правильных генов-мишеней нейрона, при экспрессии которых будет снижаться интенсивность симптомов, стимуляция высоких уровней экспрессии этих генов регулируемым образом и доставку конструкций для генной терапии в нейроны нацеленным образом. Соответственно, существует неудовлетворенная потребность в композициях и способах лечения синдрома Ретта и других ассоциированных с *meCP2* заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящем изобретении представлены нуклеиновые кислоты, содержащие кассету экспрессии на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где кассета экспрессии на основе AAV содержит в направлении от 5' до 3': 5' инвертированный концевой повтор (ITR); синтетический зависимый от активности промотор; ген, ассоциированный с синдромом Ретта, и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления промотор управляет экспрессией гена, ассоциированного с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой MECP2-независимый промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора непосредственно-раннего гена нейронов. В некоторых вариантах осуществления непосредственно-ранний ген нейронов выбран из группы, состоящей из гена *Arc*, гена *c-fos* и гена *egr-1*. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит минимальный промотор гена *Arc* (ArcMin).

[0008] В некоторых вариантах осуществления ArcMin представляет собой ArcMin человека (hArcMin). В некоторых вариантах осуществления hArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит элемент ответа на циклический АМФ (CRE), элемент на ответа сыворотку (SRE), элемент ответа на синаптическую активность (SARE), элемент ответа на MEF2 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит элемент ответа на синаптическую активность (SARE). В некоторых вариантах осуществления элемент ответа на синаптическую активность (SARE) представляет собой элемент ответа на синаптическую активность человека (hSARE). В некоторых вариантах

осуществления hSARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит ArcMin человека (hArcMin) и по меньшей мере один hSARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит hArcMin и один hSARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит hArcMin и пять hSARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0009] В некоторых вариантах осуществления промотор связывается с зависимым от нейронной активности фактором транскрипции. В некоторых вариантах осуществления зависимый от нейронной активности фактор транскрипции представляет собой белок, связывающий отвечающий на цАМФ элемент (CREB), фактор усиления миоцитов 2 (MEF2), фактор ответа на сыворотку (SRF) или Elk-1. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), метил-СрG-связывающий белок 2 (MECP2), белок хантингтин, ассоциированный с болезнью Хантингтона белок 1, гомеобокс 2 Orthodenticle (OTX-2), регулятор ионного транспорта 1, содержащий FXYD-домен (FXYD1), нейрексин-2-альфа (NRXN2) или гамма-субъединицу протеинкиназы C (PRKCG). В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). В некоторых вариантах осуществления BDNF представляет собой BDNF человека. В некоторых вариантах осуществления BDNF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7 или последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0010] В некоторых вариантах осуществления длина по меньшей мере одного из 5' ITR и 3' ITR составляет от приблизительно 110 до приблизительно 160 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR имеет такую же длину, что и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR и 3' ITR имеют разные длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из 5' ITR и 3' ITR выделен или получен из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR содержит

последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления 3' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0011] В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) или длинную 3' UTR BDNF. В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF или длинная 3' UTR BDNF располагается между геном, ассоциированным с синдромом Ретта, и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR BDNF. В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит длинную 3' UTR BDNF. В некоторых вариантах осуществления длинная 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0012] В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования, выделенный или полученный из одного или более из следующих генов: гена вируса обезьян 40 (SV40), rBG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) или гормона роста крупного рогатого скота (bGH). В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования bGH. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования bGH содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0013] В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит по меньшей мере одну спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна спейсерная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность Козак, где последовательность Козак перекрывается со старт-кодоном гена, ассоциированного с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или

последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; SEQ ID NO: 4 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или SEQ ID NO: 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0014] В настоящем изобретении представлены плазмиды, содержащие любую из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. В настоящем изобретении также представлены клетки, содержащим любую из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, или любую из плазмид, раскрытых в данном документе. В настоящем изобретении дополнительно представлены способы получения рекомбинантного вектора на основе AAV, при этом способ включает приведение клетки-продуцента AAV в контакт с любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, или любой из плазмид, раскрытых в данном документе. В настоящем изобретении представлены рекомбинантные векторы на основе AAV, полученные с помощью любого из способов получения рекомбинантного вектора на основе AAV, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор происходит из серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц и AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой односторонней AAV (ssAAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой самокомплементарный AAV (scAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV содержит капсидный белок из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV содержит капсидный белок с одной или более заменами или мутациями по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа.

[0015] В настоящем изобретении представлены композиции, содержащие (a) любую из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любую из плазмид, раскрытых в данном документе, любую из клеток, раскрытых в данном документе, или любой из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе; и (b) фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем изобретении представлены способы экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, у субъекта, нуждающегося в этом,

включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любой из плазмид, раскрытых в данном документе, любой из клеток, раскрытых в данном документе, или любого из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе, или любой из композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется синдром Ретта.

[0016] В настоящем изобретении представлены способы лечения или задержки проявления синдрома Ретта у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любой из плазмид, раскрытых в данном документе, любой из клеток, раскрытых в данном документе, или любого из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе, или любой из композиций, раскрытых в данном документе. В настоящем изобретении представлены способы экспрессии нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любой из плазмид, раскрытых в данном документе, любой из клеток, раскрытых в данном документе, или любого из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе, или любой из композиций, раскрытых в данном документе.

[0017] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется когнитивное нарушение или обусловленное стрессом нарушение. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется депрессия, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменция, нервная анорексия и нервная булимия, шизофрения, эпилепсия, посттравматическое стрессовое расстройство, ожирение, синдром Ретта или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

[0018] В настоящем изобретении представлены способы лечения или задержки проявления ассоциированного с BDNF заболевания у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любой из плазмид, раскрытых в данном документе, любой из клеток, раскрытых в данном документе, или любого из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе, или любой из композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой когнитивное нарушение и/или обусловленное стрессом нарушение. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой депрессию, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь

Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменцию, нервную анорексию, нервную булимию, шизофрению, эпилепсию, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное заболевание, синдром Ретта, большое депрессивное расстройство или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

[0019] В настоящем изобретении представлены способы лечения или задержки проявления ассоциированного с МЕСР2 заболевания у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе, любой из плазмид, раскрытых в данном документе, любой из клеток, раскрытых в данном документе, или любого из рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытых в данном документе, или любой из композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с МЕСР2 заболевание, представляет собой синдром дупликации МЕСР2, тяжелую неонатальную энцефалопатию, связанную с МЕСР2, синдром PPM-X или синдром Ретта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, плазмиду, клетку, рекомбинантный вектор на основе AAV или композицию вводят путем инъекции в центральную нервную систему. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, экспрессируется в нейронах субъекта. В некоторых вариантах осуществления нейроны представляют собой активные нейроны.

[0020] Эти и другие варианты осуществления рассматриваются более подробно в подробном описании, приведенном ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0021] Комплект документов настоящего патента или заявки содержит по меньшей мере один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации настоящего патента или заявки на патент с цветным(-ыми) рисунком(-ами) будут предоставлены Ведомством после запроса и оплаты необходимой пошлины.

[0022] На **фиг. 1** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген BDNF (SEQ ID NO: 7), короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0023] На **фиг. 2** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген BDNF (SEQ ID NO: 7), полиА-сигнал bGH (SEQ ID

NO: 9) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0024] На **фиг. 3** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген BDNF (SEQ ID NO: 7) и длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0025] На **фиг. 4** показаны схематические изображения кассет экспрессии на основе AAV для экспрессии репортерных генов, содержащих конститутивный («C») промотор hSyn или зависимый от активности («AD») промотор hSARE-hArcMin. Элементы кассет экспрессии также перечислены в таблице 3.

[0026] На **фиг. 5A** представлен столбчатый график, показывающий флуоресценцию репортерного белка в клетках, не обработанных тетродотоксином (TTX), относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ TTX. На **фиг. 5B** представлен столбчатый график, показывающий флуоресценцию репортерного белка в клетках, обработанных с помощью 150 мМ KCl, относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ TTX. На **фиг. 5C** представлен столбчатый график, показывающий флуоресценцию репортерного белка в клетках, обработанных с помощью 30 мкМ бикикулина (BIC), относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ TTX. Каждый из столбиков показывает относительную флуоресценцию клеток, трансдуцированных векторами на основе AAV, содержащими указанные кассеты экспрессии на основе AAV, при множественности заражения (MOI), указанной по оси X.

[0027] На **фиг. 6A** представлен график, показывающий относительную экспрессию репортерного гена в клетках, трансдуцированных векторами на основе AAV, содержащими указанные кассеты экспрессии на основе AAV, которые были обработаны с помощью 30 мкМ BIC, а далее либо обработаны с помощью 2 мкМ TTX, либо оставлены без обработки TTX, как указано. На **фиг. 6B** представлен график, показывающий относительную экспрессию репортерного гена в клетках, трансдуцированных векторами на основе AAV, содержащими зависимые от активности (AD) кассеты экспрессии на основе AAV, которые были обработаны с помощью 30 мкМ BIC, а далее либо обработаны с помощью 2 мкМ TTX, либо оставлены без обработки TTX, как указано.

[0028] На **фиг. 7** представлены микроскопические изображения, демонстрирующие флуоресценцию mScarlet (верхние изображения) и окрашивание маркером нейронов, антителом к бета III тубулину (нижние изображения), нейронов, трансдуцированных

векторами на основе AAV, содержащими указанные конститутивные (С) кассеты экспрессии на основе AAV.

[0029] На **фиг. 8** представлены микроскопические изображения, демонстрирующие окрашивание ДНК красителем Hoescht, флуоресценцию dmScarlet, окрашивание антителом к бета III тубулину и наложение изображений нейронов, трансдуцированных векторами на основе AAV, содержащим кассету экспрессии на основе AAV «AD-dmScar-bGH». На верхней панели показаны изображения клеток, обработанных с помощью 2 мкМ ТТХ и 30 мкМ ВИС, а на нижней панели показаны изображения клеток, не обработанных ТТХ, но обработанных с помощью 30 мкМ ВИС.

[0030] На **фиг. 9А** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 26 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID NO: 38), ген mScarlet (SEQ ID NO: 36), короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 9В** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 27 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID NO: 38), ген mScarlet (SEQ ID NO: 36) и длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 9С** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 28 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID NO: 38), ген mScarlet (SEQ ID NO: 36), полиА-сигнал bGH (SEQ ID NO: 9) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0031] На **фиг. 10А** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 29 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID NO: 38), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35), короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 10В** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 30 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID NO: 38), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35) и длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 10С** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 31 и содержащая следующие элементы: промотор hSyn (SEQ ID

NO: 38), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35), полиА-сигнал bGH (SEQ ID NO: 9) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0032] На **фиг. 11А** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 32 и содержащая следующие элементы: промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35), короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 11В** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 и содержащая следующие элементы: промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35) и длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2). На **фиг. 11С** показана кассета экспрессии на основе AAV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 34 и содержащая следующие элементы: промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6), ген dmScarlet (SEQ ID NO: 35), полиА-сигнал bGH (SEQ ID NO: 9) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13), все из которых фланкированы 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2).

[0033] На **фиг. 12** представлены микроскопические изображения, демонстрирующие окрашивание ДНК красителем Hoescht, флуоресценцию dmScarlet, окрашивание антителом к бета III тубулину и наложение изображений нейронов, трансдуцированных векторами на основе AAV, содержащим кассету экспрессии на основе AAV «AD-dmScarlet-длинная UTR». На верхней панели показаны изображения клеток, обработанных с помощью 2 мкМ TTX и 30 мкМ BIC, а на нижней панели показаны изображения клеток, не обработанных TTX, но обработанных с помощью 30 мкМ BIC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0034] Синдром Ретта представляет собой редкое генетическое неврологическое нарушение, которое встречается преимущественно у девочек. Симптомы синдрома, которые проявляются в возрасте от 6 до 18 месяцев, могут включать одно или более из следующего: проблемы с речью, проблемы с координацией, повторяющиеся движения, замедленный рост, проблемы с ходьбой, меньший размер головы, судороги, сколиоз, когнитивные нарушения и проблемы со сном. У пациентов с синдромом Ретта может наблюдаться любая комбинация этих симптомов, при этом степени тяжести каждого из них варьируются.

[0035] Синдром Ретта вызывается генетической мутацией в гене *meCP2*, который кодирует метил-СрG-связывающий белок 2 (MECP2). См. № доступа в UniProt P51608, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Более 620 мутаций в гене *meCP2*, многие из которых представляют собой вставки или делеции одной пары оснований, были выявлены у женских особей с синдромом Ретта. MECP2 вносит вклад в нормальное функционирование нервных клеток и присутствует в зрелых нервных клетках на высоких уровнях. Метил-СрG-связывающий (MBD) домен MECP2 может распознавать области ДНК с модификацией 5-метил-цитозином. Мутации в гене *meCP2* могут также вызывать другие заболевания, такие как синдром дупликации MECP2, тяжелая неонатальная энцефалопатия, связанная с MECP2, и синдром PPM-X. Не существует одобренных видов терапии для лечения любого из заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *meCP2*.

[0036] В настоящем изобретении представлены нуклеиновые кислоты (содержащие кассеты экспрессии на основе AAV), векторы на основе AAV и композиции для применения в способах лечения и/или задержки проявления заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *meCP2*, таких как синдром Ретта. Также в данном документе представлены способы лечения и/или задержки проявления заболеваний, ассоциированных с нейротрофическим фактором головного мозга (BDNF).

Определения

[0037] В данном документе в описании и прилагаемой формуле изобретения используются следующие термины.

[0038] Предусмотрено, что Формы единственного числа включают также формы множественного числа, если контекст явно не указывает на иное.

[0039] Кроме того, подразумевается, что используемый в данном документе термин «приблизительно» при ссылке на измеряемое значение, такое как величина длины полинуклеотидной или полипептидной последовательности, дозы, времени, температуры и т. п., охватывает колебания $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ или даже $\pm 0,1\%$ от указанной величины.

[0040] Кроме этого, используемый в данном документе «и/или» относится и охватывает любые и все возможные комбинации одного или более из ассоциированных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в виде альтернативы («или»).

[0041] Термин «дикий тип» представляет собой термин из области техники, понятной специалистам, и он означает типичную форму организма, штамма, гена, белка или характеристики в том виде, в котором они встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм. Например, белок дикого типа является типичной формой этого белка в том виде, в котором он встречается в природе.

[0042] Термин «мутантный белок» представляет собой термин из области техники, понятной специалистам, и он относится к белку, который отличается от формы дикого типа белка на основании наличия аминокислотных модификаций, таких как, например, аминокислотные замены, вставки и/или делеции. Термин «мутантный ген» представляет собой термин из области техники, понятной специалистам, и он относится к гену, который отличается от формы дикого типа гена на основании наличия модификаций нуклеиновой кислоты, таких как, например, замены, вставки и/или делеции в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления мутантный ген кодирует мутантный белок.

[0043] «Нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» представляет собой последовательность нуклеотидных оснований, например, РНК, ДНК или гибридные последовательности ДНК-РНК (включающие как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе нуклеотиды). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретения представляют собой последовательности либо одонитевой, либо двухнитевой ДНК. Длина нуклеиновой кислоты может составлять 1–1000, 1000–10000, 10000–100000, 100000–1 миллион или более 1 миллиона нуклеотидов. Нуклеиновая кислота обычно будет содержать фосфодиэфирные связи, хотя в некоторых случаях включены аналоги нуклеиновых кислот, которые могут иметь альтернативные остовы, содержащие, например, фосфорамидные, фосфотиоатные, фосфодитиоатные, O-метилфосфорамидитные связи, и остовы и связи пептидных нуклеиновых кислот. Другие аналоги нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты с положительно заряженными остовами, неионогенными остовами и нерибозными остовами. Нуклеиновые кислоты, содержащие один или более карбоциклических сахаров, также включены в определение нуклеиновых кислот. Эти модификации рибозо-фосфатного остова могут облегчить добавление меток или увеличить стабильность и период полужизни таких молекул в физиологических средах. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть линейными или могут быть кольцевыми (например, плазмидой).

[0044] Используемый в данном документе термин «промотор» относится к одной или более последовательностям контроля нуклеиновой кислоты, которые управляют

транскрипцией функционально связанной нуклеиновой кислоты. Промоторы могут включать последовательности нуклеиновой кислоты вблизи сайта старта транскрипции, такие как элемент ТАТА. Промоторы могут также включать цис-действующие полинуклеотидные последовательности, которые могут быть связаны факторами транскрипции.

[0045] «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве условий окружающей среды и стадий развития. «Индукцируемый» промотор представляет собой промотор, который активен при регуляции окружающей среды или стадий развития. Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор или набор сайтов связывания факторов транскрипции) и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, где последовательность контроля экспрессии управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

[0046] «Кассета экспрессии на основе AAV» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая упаковывается в рекомбинантный вектор на основе AAV и содержит последовательность, кодирующую один или более трансгенов. Когда вектор AAV приводится в контакт с клеткой-мишенью, трансгены экспрессируются клеткой-мишенью.

[0047] Используемые в данном документе термины «вектор на основе вируса», «вирусный вектор» или «вектор доставки гена» относятся к вирусной частице, которая функционирует как средство доставки нуклеиновой кислоты и которая предусматривает нуклеиновую кислоту (например, кассету экспрессии на основе AAV), упакованную в вирион. Иллюстративные вирусные векторы по настоящему изобретению включают векторы на основе аденовируса, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), векторы на основе лентивируса и векторы на основе ретровируса.

[0048] Используемый в данном документе термин «аденоассоциированный вирус» (AAV) включает без ограничения AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (в том числе типов 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV типа rh32.33, AAV типа rh8, AAV типа rh10, AAV типа rh74, AAV типа hu.68, AAV птиц, AAV крупного рогатого скота, AAV собак, AAV лошадей, AAV овец, AAV змей, AAV бородатой ящерицы, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B и любой другой AAV, известный в настоящее время или открытый позднее. См., например, таблицу 1.

Таблица 1. Серотипы аденоассоциированного вируса

	Номер доступа в GenBank		Номер доступа в GenBank		Номер доступа в GenBank
Полные геномы		Клада С		Rh57	AY530569
Аденоассоциированный вирус 1	NC_002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563
Аденоассоциированный вирус 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Аденоассоциированный вирус 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Аденоассоциированный вирус 3В	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Аденоассоциированный вирус 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Аденоассоциированный вирус 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Аденоассоциированный вирус 6	NC_001862, AAB95450.1	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
AAV птиц ATCC VR- 865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
Штамм DA-1 AAV птиц	NC_006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
AAV крупного рогатого скота	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852
AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Клада А		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu3	AY530595	Клада F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu.48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596

Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400.1
Hu 46	AY530609	Клада D		HSC2	MI332401.1
Клада B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402.1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403.1
Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405.1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404.1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407.1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408.1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409.1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406.1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410.1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411.1
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412.1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413.1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414.1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415.1
Hu57	AY530619	Клада E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Клональный изолят	
Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729
Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV 3B	NC_001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Другие	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV бородатой ящерицы	

Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	AAV змей	NC_006148.1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

[0049] Термины «продуцирующая вирус клетка», «линия продуцирующих вирус клеток» или «клетка-продуцент вируса» относятся к клеткам, используемым для продуцирования вирусных векторов. Клетки HEK293 и 293T являются общеизвестными линиями продуцирующих вирус клеток. В таблице 2 ниже перечислены иллюстративные линии продуцирующих вирус клеток для различных вирусных векторов.

Таблица 2. Иллюстративные линии продуцирующих вирус клеток

Вектор на основе вируса	Иллюстративная(-ые) линия(-ии) продуцирующих вирус клеток
Аденовирус	HEK293, 911, pTG6559, PER.C6, GH329, N52.E6, HeLa-E1, UR, VLI-293
Аденоассоциированный вирус (AAV)	HEK293, Sf9
Ретровирус	HEK293
Лентивирус	293T

[0050] «HEK293» относится к линии клеток, первоначально полученной из клеток эмбриональной почки человека, выращенных в культуре ткани. Линия клеток HEK293 с легкостью растет в культуре и обычно используется для продуцирования вирусов. Используемый в данном документе «HEK293» может также относиться к одному или более из вариантов линий клеток HEK293, т. е. линий клеток, полученных из исходной линии клеток HEK293, которые дополнительно содержат одно или более генетических изменений. Многие варианты линии HEK293 были разработаны и оптимизированы для одного или более видов конкретного применения. Например, линия клеток 293T содержит большой Т-антиген SV40, который обеспечивает эписомальную репликацию трансфицированных

плазмид, содержащих точку начала репликации SV40, что приводит к повышенной экспрессии требуемых генных продуктов.

[0051] «Sf9» относится к линии клеток насекомых, которая является клональным изолятом, полученным из родительской линии клеток *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE. Клетки Sf9 можно выращивать в отсутствие сыворотки крови, и их можно культивировать в прикрепленном состоянии или в суспензии.

[0052] «Реагент для трансфекции» означает композицию, которая усиливает перенос нуклеиновой кислоты в клетки. Некоторые реагенты для трансфекции, обычно используемые в уровне техники, включают один или более липидов, которые связываются с нуклеиновыми кислотами и с клеточной поверхностью (например, Lipofectamine™).

[0053] Способы определения сходства или идентичности последовательностей между двумя или более аминокислотными последовательностями известны в данной области техники. Сходство или идентичность последовательностей можно определять с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательностей от Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), алгоритм выравнивания для определения идентичности последовательностей от Needleman & Wunsch, *J Mol. Biol.* 48,443 (1970), способ поиска сходства от Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,2444 (1988), с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения для генетических исследований Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин), программы для выравнивания последовательностей Best Fit, описанной в Devereux et al., *Nucl. Acid Res.* 12, 387–395 (1984) или с помощью просмотра.

[0054] Другим подходящим алгоритмом является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., *J Mol. Biol.* 215, 403–410, (1990) и Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873–5787 (1993). Особенно применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена от Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266, 460–480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. В WU-BLAST-2 используется несколько параметров поиска, которые необязательно устанавливаются в виде значений по умолчанию. Параметры представляют собой динамические значения и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой ведется поиск представляющей интерес последовательности; однако значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

[0055] Кроме того, дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с гэпами, изложенный в Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

[0056] Используемые в данном документе «лечение», или «осуществление лечения», или «облегчение», или «уменьшение интенсивности» используют взаимозаменяемо. Эти термины относятся к подходу получения полезных или требуемых результатов, включая без ограничения терапевтическую пользу и/или профилактическую пользу. Терапевтическая польза относится к любому терапевтически значимому улучшению или эффекту в отношении одного или более заболеваний, состояний или симптомов под действием лечения. В случае профилактической пользы композиции могут вводиться субъекту, подверженному риску развития конкретного заболевания, состояния или симптома, или субъекту, сообщающему об одном или более физиологических симптомах заболевания, даже если заболевание, состояние или симптом могли еще не проявиться.

[0057] Термины «субъект», «индивидуум» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения позвоночного, такого как млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой, например, мышь, крысу, кролика, кошку, собаку, свинью, овцу, лошадь, отличного от человека примата (например, яванского макака, шимпанзе) или человека. Также охватываются ткани и клетки субъекта или их производные, полученные *in vivo* или культивируемые *in vitro*. Субъект-человек может быть взрослым, подростком, ребенком (от 2 лет до 14 лет), младенцем (от 1 месяца до 24 месяцев) или новорожденным (вплоть до 1 месяца). В некоторых вариантах осуществления взрослые являются пожилыми людьми в возрасте приблизительно 65 лет или старше, или приблизительно 60 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления субъектом является беременная женщина или женщина, планирующая беременность.

[0058] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству средства, которое достаточно для достижения результата, например, для осуществления благоприятных или требуемых результатов. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от одного или более из следующего: субъекта и заболевания, подлежащих лечению, массы и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т. п., что может с легкостью определить специалист средней квалификации в данной области техники. Специфическая доза может варьироваться в зависимости от одного или более из выбранного конкретного средства, схемы введения доз, вводится ли оно в комбинации с другими соединениями,

выбора времени введения, ткани, подлежащей визуализации, и физической системы доставки, в которой оно переносится.

[0059] Используемый в данном документе термин «генная терапия» относится к процессу введения генетического материала в клетки для компенсации аномальных генов или для получения терапевтического белка.

[0060] Как используется в данном документе, считается, что нейрон является «активным» нейроном или характеризуется «нейронной активностью», если деполяризуется по меньшей мере часть плазматической мембраны нейрона. В некоторых вариантах осуществления деполяризацию вызывает открытие потенциалозависимых Na^+ каналов. В некоторых вариантах осуществления деполяризация плазматической мембраны нейрона приводит к инфлюксу ионов Ca^{2+} в клетку и запускает последующую транскрипцию непосредственно-ранних генов (IEG). *In vivo* деполяризация по меньшей мере части плазматической мембраны постсинаптического нейрона может быть запущена сигналом от пресинаптического нейрона. *In vitro* деполяризация может быть индуцирована обработкой нейронов с помощью KCl. Деполяризация также может быть простимулирована *in vitro* с применением низкомолекулярных соединений (*например*, бикукуллина) для инактивации сигнальных рецепторов, таких как рецептор γ -аминомасляной кислоты типа A (GABA_A), который в норме замедляет деполяризацию за счет открытия Cl^- или K^+ каналов.

[0061] Как используется в данном документе, считается, что нейрон является «покоящимся» нейроном, когда собственный поток ионов через плазматическую мембрану нейрона отсутствует. В некоторых вариантах осуществления изобретения ни одна часть плазматической мембраны покоящегося нейрона не деполяризуется. В некоторых вариантах осуществления покоящийся нейрон характеризуется мембранным потенциалом покоя, составляющим приблизительно -70 мВ.

Кассеты экспрессии на основе AAV

[0062] В настоящем изобретении представлены последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие одну или более кассет экспрессии на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' инвертированный концевой повтор (ITR), промотор, трансген и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой ген, ассоциированный с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность Козак, последовательность полиаденилирования и/или спейсерную последовательность.

[0063] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними).

(i) Инвертированный концевой повтор

[0064] Последовательности инвертированного концевого повтора или ITR представляют собой последовательности, которые опосредуют интеграцию провируса AAV и упаковку ДНК AAV в вирионы. ITR вовлечены в различные активности в жизненном цикле AAV. Например, последовательности ITR, которые могут образовывать шпилечную структуру, играют роль в вырезании из плазмиды после трансфекции, репликации генома вектора, а также интеграции и выделении из генома клетки-хозяина.

[0065] Кассеты экспрессии на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать 5' ITR и 3' ITR. Длина последовательностей ITR могут составлять от приблизительно 110 до приблизительно 160 нуклеотидов, например, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 или 160 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина последовательностей ITR может составлять приблизительно 141

нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR имеет такую же длину, что и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR и 3' ITR имеют разные длины. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR длиннее 3' ITR, а в других вариантах осуществления 3' ITR длиннее 5' ITR.

[0066] ITR могут быть выделены или получены из генома любого AAV, например, AAV, представленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из 5' ITR и 3' ITR выделен или получен из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из 5' ITR и 3' ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутантный ITR, выделенный или полученный из представителя другого вида парвовирусов, кроме AAV. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR может представлять собой ITR дикого типа или мутантный ITR, выделенный или полученный из бокавируса или парвовируса B19.

[0067] В некоторых вариантах осуществления ITR содержит модификацию, стимулирующую продуцирование scAAV. В некоторых вариантах осуществления модификация, стимулирующая продуцирование scAAV, представляет собой делецию последовательности концевой разрешения (TRS) из ITR. В некоторых вариантах осуществления 5' ITR представляет собой ITR дикого типа, а 3' ITR представляет собой мутантный ITR, в котором отсутствует последовательность концевой разрешения. В некоторых вариантах осуществления 3' ITR представляет собой ITR дикого типа, а 5' ITR представляет собой мутантный ITR, в котором отсутствует последовательность концевой разрешения. В некоторых вариантах осуществления последовательность концевой разрешения отсутствует как в 5' ITR, так и в 3' ITR. В других вариантах осуществления модификация, стимулирующая продуцирование scAAV, представляет собой замену ITR на другую образующую шпильку последовательность, например, на образующую shRNA последовательность.

[0068] В некоторых вариантах осуществления 5' ITR может содержать последовательность под SEQ ID NO: 1 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними). В некоторых вариантах осуществления 3' ITR может содержать последовательность

под SEQ ID NO: 2 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними). В некоторых вариантах осуществления 5' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 1, а 3' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0069] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV содержат один или более «суррогатных» ITR, т. е. отличных от ITR последовательностей, которые выполняют ту же функцию, что и ITR. *См., например, Xie, J. et al., Mol. Ther., 25(6): 1363–1374 (2017).* В некоторых вариантах осуществления ITR в кассете экспрессии на основе AAV замещен суррогатным ITR. В некоторых вариантах осуществления суррогатный ITR содержит образующую шпильку последовательность. В некоторых вариантах осуществления суррогатный ITR представляет собой последовательность, образующую короткую шпилечную (sh)RNA.

(ii) Зависимые от активности промоторы

[0070] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV, описанные в данном документе, содержат промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой синтетический промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из эндогенного промотора и/или эндогенного энхансера. В некоторых вариантах осуществления промотор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из области, расположенной выше кодона инициации транскрипции гена. Последовательность нуклеиновой кислоты может находиться в пределах от 1 пары оснований (п. о.) до приблизительно 8000 п. о. выше кодона инициации транскрипции, например, в пределах приблизительно 10 п. о., 50 п. о., 100 п. о., 500 п. о., 1000 п. о., 1500 п. о., 2000 п. о., 2500 п. о., 3000 п. о., 3500 п. о., 4000 п. о., 4500 п. о., 5000 п. о., 5500 п. о., 6000 п. о., 6500 п. о., 7000 п. о., 7500 п. о. или 8000 п. о., включая все поддиапазоны и значения, лежащие между ними, выше кодона инициации транскрипции.

[0071] Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что функция MECР2 вносит вклад в экспрессию генов-мишеней, вовлеченных в функцию нейрона. Когда MECР2 мутирует, экспрессия этих генов-мишеней нарушается. Восстановление экспрессии

этих генов-мишеней независимым от МЕСР2 способом может облегчить симптомы заболеваний, ассоциированных с мутациями в МЕСР2 или вызванных ими. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой МЕСР2-независимый промотор. Используемый в данном документе «МЕСР2-независимый промотор» относится к промотору, функция которого не нарушается при снижении функции МЕСР2 или потере функции МЕСР2.

[0072] Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что конститутивная экспрессия генов-мишеней, вовлеченных в функцию нейрона, может быть вредной. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления функция промотора зависит от присутствия одного или более стимулов. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой зависимый от активности промотор. Используемая в данном документе функция «зависимого от активности промотора», используемого взаимозаменяемо с «зависимым от нейронной активности промотором», индуцируется нейронной активностью. В некоторых вариантах осуществления зависимый от активности промотор индуцируется инфлюксом ионов кальция в нейрон. В некоторых вариантах осуществления зависимый от активности промотор используется для управления экспрессией любого гена-мишени, который при конститутивной экспрессии в клетке (такой как нейрон) является вредным.

[0073] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора и/или энхансера непосредственно-раннего гена нейронов. Наименование непосредственно-раннего гена нейронов не ограничено, и он может относиться к любому непосредственно-раннему гену нейронов, известному в данной области техники или идентифицированному в будущем. Неограничивающие примеры непосредственно-ранних генов нейронов включают ген *Arc*, ген *c-fos* и ген *egr-1*. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора и/или энхансера гена *Arc*, гена *c-fos* или гена *egr-1*. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора и/или энхансера гена нейротрофина. Неограничивающие примеры генов нейротрофина включают ген *bdnf* (нейротрофического фактора головного мозга), ген *ngf* (фактора роста нервов), ген *нейротрофина-3* и ген *нейротрофина-4*.

[0074] В некоторых вариантах осуществления промотор способен связываться с одним или более зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции.

Используемый в данном документе «зависимый от нейронной активности фактор транскрипции» представляет собой фактор транскрипции, который активируется в ответ на нейронную активность. В некоторых вариантах осуществления зависимый от нейронной активности фактор транскрипции стимулирует экспрессию гена в ответ на нейронную активность. В некоторых вариантах осуществления зависимый от нейронной активности фактор транскрипции подавляет экспрессию гена в ответ на нейронную активность. В некоторых вариантах осуществления зависимый от нейронной активности фактор транскрипции активируется каскадами кальций-зависимой киназы.

[0075] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, которые способны связываться с одним или более зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции. Неограничивающие примеры зависимых от нейронной активности факторов транскрипции включают белок, связывающийся отвечающий на цАМФ элемент (CREB), фактор усиления миоцитов 2 (MEF2), фактор ответа на сыворотку (SRF) или Elk-1. В некоторых вариантах осуществления промотор способен связываться с более чем одним зависимым от нейронной активности фактором транскрипции, например, промотор способен связываться с 2, 3, 4 или 5 зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции. В некоторых вариантах осуществления промотор способен связываться с двумя зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции. В некоторых вариантах осуществления промотор способен связываться с тремя зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции. В некоторых вариантах осуществления промотор способен связываться со следующими зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции: CREB, MEF2 и SRF.

[0076] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит один или более элементов ответа. Используемый в данном документе «элемент ответа» представляет собой область промотора, которая участвует в управление экспрессией гена в присутствии стимулятора. В некоторых вариантах осуществления элемент ответа является критически важным, чтобы промотор управлял экспрессии гена в присутствии стимулятора. Неограничивающие примеры стимуляторов включают гормоны; раздражители окружающей среды, такие как тепло или свет; и химические ионы, такие как кальций. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит элемент ответа, который управляет экспрессией гена в присутствии кальция. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит элемент ответа, который присутствует в промоторах непосредственно-

ранних генов нейронов. В некоторых вариантах осуществления промоторы содержат элемент ответа, который присутствует в промоторе гена *Arc*, гена *c-fos* и/или гена *egr-1*.

[0077] В некоторых вариантах осуществления элемент ответа предусматривает один или более из следующего: элемент ответа на циклический АМФ (CRE), элемент ответа на сыворотку (SRE), элемент ответа на синаптическую активность (SARE) и элемент ответа на MEF2 (MRE). В некоторых вариантах осуществления промотор содержит один или более CRE; один или более SRE; один или более SARE; один или более MRE или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления элемент ответа связывается с одним или более зависимыми от нейронной активности факторами транскрипции. В некоторых вариантах осуществления CRE связывается с CREB. В некоторых вариантах осуществления SRE связывается с SRF. В некоторых вариантах осуществления MRE связывается с MEF2. В некоторых вариантах осуществления SARE связывается с CREB, MEF2 и SRF.

[0078] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит 1–20 SARE, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 SARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит 1 SARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит 5 SARE. В некоторых вариантах осуществления SARE представляет собой SARE мыши. В некоторых вариантах осуществления SARE представляет собой элемент ответа на синаптическую активность человека (hSARE). В некоторых вариантах осуществления hSARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления hSARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0079] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора гена *Arc*. В некоторых вариантах осуществления ген *Arc* представляет собой ген *Arc* мыши. В некоторых вариантах осуществления ген *Arc* представляет собой ген *Arc* человека. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит область, охватывающую нуклеиновые кислоты от -300 до +300 гена *Arc* или любой его подобласти. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит минимальный промотор гена *Arc* (ArcMin).

В некоторых вариантах осуществления ArcMin человека (hArcMin) содержит короткую вышерасположенную последовательность и 5' UTR (от -276 до +208) гена *Arc*. В некоторых вариантах осуществления ArcMin мыши (mArcMin) содержит короткую вышерасположенную последовательность и 5' UTR (от -222 до +198) гена *Arc*. В некоторых вариантах осуществления hArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления hArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0080] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит hArcMin и по меньшей мере один hSARE. Число hSARE в промоторе не ограничено и может находиться в диапазоне от 1 hSARE до 20 hSARE, например, составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 hSARE. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит hArcMin и один hSARE (называется SARE-ArcMin). В некоторых вариантах осуществления SARE-ArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления SARE-ArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит hArcMin и 5 hSARE (называется E-SARE). В некоторых вариантах осуществления E-SARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления E-SARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID

NO: 16 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. Дополнительные подробности, касающиеся hArcMin и hSARE, представлены в Kawashima et al., *Nat Methods* 10, 889–895 (2013), Kawashima et al., *Front Neural Circuits* 2014 Apr 23; 8:37, и Kawashima et al., *PNAS* January 6, 2009 106 (1) 316–32, каждая из которых включена в данный документе посредством ссылки во всей своей полноте.

[0081] В некоторых вариантах осуществления промотор индуцирует уровень экспрессии гена, который превышает таковой у эндогенного промотора непосредственно-раннего гена нейронов, такого как ген *Arc*, ген *c-fos* или ген *egr-1*. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцирует уровень экспрессии гена, который в по меньшей мере 1,5 раза превышает таковой у эндогенного промотора непосредственно-раннего гена нейронов, такого как ген *Arc*, ген *c-fos* или ген *egr-1*. В некоторых вариантах осуществления промотор индуцирует уровень экспрессии гена, который в от приблизительно 1,5 раза до приблизительно 100 раз (например, приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз или приблизительно 100 раз) превышает таковой у эндогенного промотора непосредственно-раннего гена нейронов, такого как ген *Arc*, ген *c-fos* или ген *egr-1*.

[0082] В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из одного или более промоторов, обычно используемых в данной области техники для экспрессии генов. Например, в некоторых вариантах осуществления промотор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотронеина, промотора мышиноного вируса опухоли молочной железы (MMTV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора полиэдрина, промотора куриного β -актина (CBA), промотора дигидрофолатредуктазы (DHFR) и промотора фосфоглицеринкиназы (PGK). В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора куриного β -актина (CBA), промотора EF-1 альфа или короткого промотора EF-1 альфа. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность, выбранную из любой под SEQ ID NO: 17–20 или последовательности, которая на по меньшей мере 70% идентична ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними).

[0083] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV, описанные в данном документе, дополнительно содержат энхансер. Энхансер может представлять собой, например, энхансер CMV. В некоторых вариантах осуществления энхансер содержит последовательность под SEQ ID NO: 21 или последовательность, которая на по меньшей мере 70% идентичную ей (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентична ей, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними).

[0084] В некоторых вариантах осуществления промотор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из любого одного или более из следующих промоторов: промотора HMG-COA редуктазы; регулирующего стерины элемента 1 (SRE-1); промотора фосфоенолпируваткарбоксихиназы (PEPCK); промотора С-реактивного белка (CRP) человека; промотора глюкокиназы человека; промотора холестерин-7-альфа-гидроксилазы (CYP-7); промотора бета-галактозидазы альфа-2,6-сиалилтрансферазы; промотора белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1); промотора альдолазы В; промотора трансферрина человека; промотора коллагена I типа; промотора кислой фосфатазы предстательной железы (PAP); промотора секреторного белка 94 предстательной железы (PSP 94); промотора комплекса антигена, специфического для предстательной железы; промотора гена железистого калликрейна человека (hgt-1); специфического для миоцитов энхансерного фактора связывания MEF-2; промотора мышечной креатинкиназы; промотора ассоциированного с панкреатитом белка (PAP); транскрипционного энхансера эластазы 1; специфического для поджелудочной железы энхансера-промотора амилазы и эластазы; промотора гена холестеринэстеразы поджелудочной железы; промотора утероглобина; промотора расщепления боковой цепи холестерина (SCC); промотора гамма-гамма-энолазы (нейрон-специфической энолазы, NSE); промотора тяжелой цепи нейрофиламента (NF-H); промотора CGL-1/гранзима В человека; промотора терминальной дезокситрансферазы (TdT), лямбда 5, VpreB и промотора Ick (лимфоцит-специфической тирозинпротеинкиназы p56lck); промотора CD2 человека и его 3' транскрипционного энхансера; промотора гена специфической активации НК- и Т-клеток человека (NKG5); промотора тирозинкиназы pp60c-src; промотора

органоспецифических неоантигенов (OSN), промотора с молекулярной массой 40 кДа (p40); промотора антигена-P, специфического для толстой кишки; промотора альфа-лактальбумина человека; промотора фосфоенолпируваткарбоккиназы (PEPCK), промотора HER2/neu, промотора казеина, промотора IgG, промотора хорионического эмбрионального антигена, промотора эластазы, промотора порфобилиноген-дезаминазы, промотора инсулина, промотора фактора гормона роста, промотора тирозингидроксилазы, промотора альбумина, промотора альфафетопротеина, промотора ацетил-холинового рецептора, промотора алкогольдегидрогеназы, промотора альфа- или бета-глобина, промотора Т-клеточного рецептора, промотора остеокальцина, промотора IL-2, промотора рецептора IL-2, промотора белка сыворотки молока (war) и промотор МНС класса II.

(iii) Ген, ассоциированный с синдромом Ретта

[0085] Используемый в данном документе «ген, ассоциированный с синдромом Ретта» относится к любому гену у субъекта с синдромом Ретта, на который может быть нацелена генная терапия для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома синдрома Ретта. В некоторых вариантах осуществления уровень белка, кодируемого геном, ассоциированным с синдромом Ретта, снижен или не выявляется у субъектов с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления уровни белка, кодируемого геном, ассоциированным с синдромом Ретта, снижаются после проявления по меньшей мере одного симптома синдрома Ретта. В некоторых вариантах осуществления уровни белка, кодируемого геном, ассоциированным с синдромом Ретта, повышаются при нормальном постнатальном развитии и/или развитии нейронов. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует белок, который вносит вклад в нормальную функцию нейронов. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует белок, который вовлечен в стимуляцию и/или поддержание синаптической пластичности. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, представляет собой ген нейротрофина. В некоторых вариантах осуществления у субъектов с синдромом Ретта присутствуют мутации в гене, ассоциированном с синдромом Ретта, или потеря функции гена, ассоциированного с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления мутации в гене, ассоциированном с синдромом Ретта, или потеря функции гена, ассоциированного с синдромом Ретта, вызывают синдром Ретта. В некоторых вариантах осуществления мутации в гене, ассоциированном с синдромом Ретта, или потеря функции гена, ассоциированного с синдромом Ретта, , в частности, в возбуждающих нейронах переднего

мозга, вызывают симптомы, сходные с потерей гена *tesp2*. Тип мутации не ограничен, и она может представлять собой вставку, делецию, дупликацию и/или замену.

[0086] В настоящем изобретении представлены кассеты экспрессии на основе AAV, содержащие ген, ассоциированный с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит ген, ассоциированный с синдромом Ретта, который кодирует белок, в том числе терапевтический (например, для медицинских или ветеринарных путей применения) или иммуногенный (например, для вакцин) полипептид. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит ген млекопитающих, ассоциированный с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит ген человека, ассоциированный с синдромом Ретта. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит ген, ассоциированный с синдромом Ретта, который кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), метил-СрG-связывающий белок 2 (MECP2), белок хантингтин, ассоциированный с болезнью Хантингтона белок 1, гомеобокс 2 Orthodenticle (OTX-2), регулятор ионного транспорта 1, содержащий FXYD-домен (FXYD1), нейрексин-2-альфа (NRXN2) или гамма-субъединицу протеинкиназы C (PRKCG). В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, представляет собой ген, выбранный из группы, состоящей из KCNA1 (представитель 1 подсемейства А потенциалозависимых калиевых каналов), GABRA1 (альфа-1 субъединица рецептора гамма-аминомасляной кислоты типа А), MAPK1 (митоген-активируемая протеинкиназа 1), NRXN2 (нейрексин 2), RBFOX1 (РНК-связывающий гомолог 1 Fox-1), GNAO1 (альфа-О1 субъединица G-белка), NCAN (нейрокан), PRKCG (гамма-субъединица протеинкиназы C), KCNJ4 (представитель 4 подсемейства J калиевого канала внутреннего выпрямления), CAMK2B (бета-субъединица кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II), EFNB3 (эфрин В3), GABBR1 (субъединица 1 рецептора гамма-аминомасляной кислоты типа В), LY6H (представитель H семейства лимфоцитарных антигенов 6), KCNA2 (представитель 2 подсемейства А потенциалозависимых калиевых каналов) и NEFL (легкая цепь нейрофиламента).

[0087] В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). BDNF представляет собой нейротрофин, функция которого заключается в поддержании выживания и роста нейронов, развития синапсов и пластичности. При синдроме Ретта экспрессия BDNF изменена. Потеря функции *bdnf* приводит к фенотипам, сходным с потерей функции *tesp2*,

а после потери функции *mesp2* нарушается функция BDNF. Дополнительные подробности о функции BDNF представлены в Eduardo E. Benarroch, *Neurology* Apr 2015, 84 (16) 1693–1704; Chang et al. *Neuron*. 2006; 49(3):341–348; и Zhou et al., *Neuron* 52, 255–269, October 19, 2006, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления BDNF представляет собой BDNF человека. В некоторых вариантах осуществления BDNF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления BDNF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7 или последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0088] В BDNF имеются два альтернативных полиаденилированных сайта остановки транскрипции, которые создают две разные популяции мРНК *bdnf*, либо с короткой 3' UTR (длиной приблизительно 0,35 т. о.), либо с длинной 3' UTR (длиной приблизительно 2,85 т. о.). Вариант мРНК *bdnf* с короткой 3' UTR в основном локализован в клеточном теле нейронов, тогда как вариант мРНК *bdnf* с длинной 3' UTR также локализуется в дендритах. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит короткую 3' UTR BDNF или длинную 3' UTR BDNF. В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF или длинная 3' UTR BDNF присутствует между стоп-кодоном и 3' ITR.

[0089] В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей. В некоторых вариантах осуществления короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70%

идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления длинная 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0090] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность Козак. Последовательность Козак представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая функционирует как сайт инициации трансляции белка во многих эукариотических мРНК-транскриптах. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак перекрывается со старт-кодоном. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

(iv) Сигнал полиаденилирования (полиА)

[0091] Сигналы полиаденилирования представляют собой нуклеотидные последовательности, встречающиеся почти во всех генах млекопитающих и контролирующие добавление к 3' концу транскрипта гена нити из примерно 200 остатков аденозина (поли(А)-хвост). Поли(А)-хвост вносит вклад в стабильность мРНК, и мРНК, не содержащие поли(А)-хвост, быстро разрушаются. Имеется также подтверждение того, что наличие поли(А)-хвоста вносит положительный вклад в транслируемость мРНК путем воздействия на инициацию трансляции.

[0092] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV по настоящему изобретению содержат сигнал полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может быть выбран из сигнала полиаденилирования гена вируса обезьян 40 (SV40), γ BG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) и гормона роста крупного рогатого скота (bGH).

[0093] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования bGH. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования bGH содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования bGH содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0094] В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования SV40. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования γ BG. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность под SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.

(v) Спейсерные последовательности

[0095] Векторы на основе AAV, как правило, допускают вставки ДНК, характеризующиеся определенным диапазоном размера, который обычно составляет от приблизительно 4 т. о. до приблизительно 5.2 т. о. или немного больше. Таким образом, в случае более коротких последовательностей может потребоваться включение дополнительной нуклеиновой кислоты во фрагмент вставки, чтобы достигнуть необходимой длины, которая приемлема для вектора на основе AAV. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV по настоящему

изобретению могут содержать спейсерную последовательность. Спейсерная последовательность может представлять собой, например, последовательность длиной 1–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–75, 75–100, 100–150, 150–200, 200–250, 250–300, 300–400, 400–500, 500–750, 750–1000, 1000–1500, 1500–2000, 2000–2500, 2500–3000, 3000–3500, 3500–4000, 4000–4500 или 4500–5000, или больше нуклеотидов. Спейсерная последовательность может быть расположена в кассете в любом требуемом положении, при условии, что она не препятствует функции или активности вектора. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность расположена выше 3' UTR. Например, в некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность присутствует между короткой 3' UTR и 3' ITR BDNF или между полиА-сигналом и 3' ITR bGH.

[0096] В некоторых вариантах осуществления кассета на основе AAV содержит по меньшей мере одну спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

(vi) Интронные последовательности

[0097] В некоторых вариантах осуществления кассеты экспрессии на основе AAV по настоящему изобретению могут содержать интронную последовательность. Включение интронной последовательности может усиливать экспрессию по сравнению с экспрессией в отсутствие интронной последовательности.

[0098] В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность представляет собой гибридную или химерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность выделена или получена из интронной последовательности одного или более из гена SV40, β -глобина, куриного бета-актина, мелкого вируса мышей (MVM), фактора IX и/или IgG человека (тяжелой или легкой цепи). В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность является химерной. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах

осуществления интронная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичностью, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25.

(vii) Иллюстративные кассеты экспрессии на основе AAV

[0099] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' инвертированный концевой повтор (ITR), трансген и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 7 (BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00100] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, трансген и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 7 (BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 7 (BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00101] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, трансген, последовательность полиаденилирования и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00102] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, последовательность Козак, трансген и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-

SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00103] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, последовательность Козак, трансген, последовательность полиаденилирования и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00104] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, трансген, 3' UTR и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 (короткую 3' UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 (короткую 3' UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 10 (длинную 3' UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 10 (длинную 3' UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00105] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, трансген, 3' UTR, последовательность полиаденилирования и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00106] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, последовательность Козак, трансген, 3' UTR и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00107] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, последовательность Козак, трансген, 3' UTR, последовательность полиаденилирования и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00108] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, спейсерную последовательность, промотор, последовательность Козак, трансген, 3' нетранслируемую область (3' UTR), последовательность полиаденилирования и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 13 (спейсерную последовательность), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 13 (спейсерную последовательность), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

[00109] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит 5' ITR, промотор, последовательность Козак, трансген, 3' нетранслируемую область (3' UTR), последовательность полиаденилирования, спейсерную последовательность и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 6 (hSARE-ArcMin), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH), SEQ ID NO: 13 (спейсерную последовательность) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR). В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии на основе AAV содержит SEQ ID NO: 1 (5' ITR), SEQ ID NO: 13 (спейсерную последовательность), SEQ ID NO: 16 (E-SARE), SEQ ID NO: 14 или 15 (последовательность Козак), SEQ ID NO: 7 (BDNF), SEQ ID NO: 8 или 10 (короткую или длинную 3'UTR BDNF), SEQ ID NO: 9 (последовательность полиаденилирования bGH), SEQ ID NO: 13 (спейсерную последовательность) и SEQ ID NO: 2 (3' ITR).

Способы получения AAV

[00110] Кассеты экспрессии на основе AAV, описанные в данном документе, могут быть включены в вектор (например, плаزمиды или бакмиды) с использованием стандартных методик молекулярной биологии. В настоящем изобретении представлены векторы, содержащие любую из кассет экспрессии на основе AAV, описанных в данном документе. Вектор (например, плазмиды или бакмиды) может дополнительно содержать один или более генетических элементов, используемых во ходе продуцирования AAV, в том числе, например, гены гер и сар AAV, а также белковые последовательности хелперного вируса.

[00111] Кассеты экспрессии на основе AAV и векторы (например, плазмиды), содержащие кассеты экспрессии на основе AAV, описанные в данном документе, могут быть использованы для продуцирования рекомбинантных векторов на основе AAV.

[00112] В настоящем изобретении представлены способы получения рекомбинантного вектора на основе AAV, включающие приведение клетки-продуцента AAV (например, клетки HEK293) в контакт с кассетой экспрессии на основе AAV или вектором (например, плазмидой) по настоящему изобретению. В настоящем изобретении дополнительно представлены клетки, содержащие любые из кассет экспрессии на основе AAV или векторов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки-продуцента AAV в контакт с одной или более дополнительными плазмидами, кодирующими, например, гены гер и сар AAV, а также белковые последовательности хелперного вируса. В некоторых вариантах

осуществления способ получения рекомбинантного вектора на основе AAV включает приведение клетки-производителя AAV (например, клетки насекомого, такой как клетка Sf9) в контакт с по меньшей мере одним совместимым с клеткой насекомого вектором, содержащим кассету экспрессии на основе AAV по настоящему изобретению. «Совместимый с клеткой насекомого вектор» представляет собой любое соединение или состав (биологический или химический), которые облегчают трансформацию или трансфекцию клетки насекомого нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления совместимый с клеткой насекомого вектор представляет собой бакуловирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает поддержание клетки насекомого в условиях, обеспечивающих продуцирование AAV.

[00113] В настоящем изобретении представлены рекомбинантные векторы на основе AAV, полученные с использованием любого из способов, раскрытых в данном документе. Полученные рекомбинантные векторы на основе AAV могут относиться к любому серотипу, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления полученные рекомбинантные векторы на основе AAV могут содержать одну или более аминокислотных модификаций (например, замен и/или делеций) по сравнению с нативным капсидом AAV. Например, рекомбинантные векторы на основе AAV могут представлять собой модифицированные векторы на основе AAV, полученные из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц и AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой односторонний AAV (ssAAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой самокомплементарный AAV (scAAV).

[00114] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV содержит капсидный белок из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV содержит капсидный белок с одной или более заменами или мутациями по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа. Рекомбинантные векторы на основе AAV, раскрытые в данном документе, могут быть использованы для трансдукции клеток-мишеней

последовательностью трансгена, например, путем приведения рекомбинантного вектора на основе AAV в контакт с клеткой-мишенью.

Способы экспрессии и лечения

[00115] В настоящем изобретении представлены композиции, содержащие любые из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток или рекомбинантных векторов на основе AAV, раскрытые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, содержат по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или среду-носитель, например, растворители, буферы, растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или среда-носитель могут предусматривать физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, стерильный изотонический водный буфер и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или среда-носитель предусматривают забуференный фосфатом физиологический раствор, стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло, маннит фармацевтической степени чистоты, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) или их подходящие смеси. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, дополнительно содержат незначительные количества эмульгирующих или смачивающих средств, или буферных средств для поддержания pH.

[00116] В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, дополнительно содержат другие традиционные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы, такие как хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновая кислота, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол, параклорфенол или альбумин. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать антибактериальные и противогрибковые средства, такие как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота или тимеросал; изотонические средства, такие как сахара или хлорид натрия, и/или средства, задерживающие всасывание, такие как моностеарат алюминия и желатин.

[00117] В настоящем изобретении представлены способы доставки гена, ассоциированного с синдромом Ретта, в клетку путем приведения клетки в контакт с любыми из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой делящуюся клетку, такую как культивируемая клетка в культуре клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой неделящуюся клетку. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, доставляют в клетку *in vitro*, например, для получения *in vitro* полипептида, ассоциированного с синдромом Ретта, или для генной терапии *ex vivo*.

[00118] В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, доставляют субъекту, нуждающемуся в этом, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида. Таким образом, полипептид или функциональная РНК могут быть получены *in vivo* в организме субъекта. Таким образом, в настоящем изобретении представлены способы экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества любых из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе. В настоящем изобретении также представлены способы лечения и/или задержки проявления по меньшей мере одного симптома синдрома Ретта у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой нуклеиновой кислоты из любых нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется синдром Ретта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется высокий риск развития синдрома Ретта; например, субъект является новорожденным, который идентифицирован как носитель мутации в гене *meCP2*. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, является мишенью генной терапии для усиления его экспрессии и/или функции. В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, является мишенью генной терапии для снижения его экспрессии и/или функции.

[00119] В настоящем изобретении представлены способы лечения и/или задержки проявления ассоциированного с МЕСР2 заболевания у субъекта, включающие введение

субъекту терапевтически эффективного количества любых из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе. Используемое в данном документе «ассоциированное с MECP2 заболевание» представляет собой заболевание, которое коррелирует с или вызвано генетическими изменениями (например, одной или более делециями, вставками, дупликациями и/или заменами) гена *meCP2* по сравнению с геном *meCP2* дикого типа и/или изменениями экспрессии и/или активности белка MECP2 по сравнению с белком MECP2 дикого типа.

[00120] В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с MECP2 заболевание, представляет собой синдром дупликации MECP2, тяжелую неонатальную энцефалопатию, связанную с MECP2, синдром PPM-X или синдром Ретта. Синдром дупликации MECP2 вызывается дупликацией гена MECP2, и он характеризуется умственной отсталостью, задержкой развития и судорогами. Дупликация гена MECP2 приводит к продуцированию дополнительного белка MECP2 и усилению функции белка, что приводит к аномальной функции нейронов. Тяжелая неонатальная энцефалопатия, связанная с MECP2, вызывается мутациями в гене *meCP2*, большинство из которых представляют собой вставки, делеции или замены одной пары оснований. Это состояние поражает почти исключительно мужских особей, и они характеризуются маленьким размером головы (микроцефалия), двигательными нарушениями, проблемами с дыханием и судорогами. Мутации в гене *meCP2* могут изменять структуру белка MECP2 или уменьшать количество продуцируемого белка. Синдром PPM-X представляет собой заболевание, характеризующееся легкой или тяжелой умственной отсталостью, биполярным расстройством и паттерном аномалий движений. Примерно половина всех случаев синдрома PPM-X вызвана одной из восьми мутаций в гене *meCP2*. Эти мутации вызывают либо вставки, делеции или замены аминокислот в белке MECP2, либо создают преждевременный стоп-сигнал в мРНК *meCP2*.

[00121] В настоящем изобретении дополнительно представлены способы лечения и/или задержки проявления ассоциированного с BDNF заболевания у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любых из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе. Используемое в данном документе «ассоциированное с BDNF заболевание» представляет собой заболевание, которое коррелирует с генетическими изменениями гена *bdnf* и/или изменениями экспрессии и/или активности белка BDNF, или вызвано ими. В некоторых

вариантах осуществления ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой когнитивное нарушение и/или обусловленное стрессом нарушение. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой депрессию, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, деменцию, нервную анорексию, нервную булимию, шизофрению, эпилепсию, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное заболевание, синдром Ретта, большое депрессивное расстройство или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

[00122] В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, экспрессируется в нейронах субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах, чем в отличных от нейронов клетках организма. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена, ассоциированного с синдромом Ретта, не выявляется в отличных от нейронов клетках. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза (например, приблизительно 1,5 раза, приблизительно 2 раза, приблизительно 2,5 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 3,5 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 4,5 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 5,5 раза, приблизительно 6 раз, приблизительно 6,5 раза, приблизительно 7 раз, приблизительно 7,5 раза, приблизительно 8 раз, приблизительно 8,5 раза, приблизительно 9 раз, приблизительно 9,5 раза, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз или приблизительно 100 раз, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) по сравнению с таковым в отличных от нейронов клетках организма.

[00123] В некоторых вариантах осуществления нейроны представляют собой активные нейроны. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, в активных нейронах выше, чем в покоящихся нейронах организма. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена, ассоциированного с синдромом Ретта, не выявляется в покоящихся нейронах. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза (например, приблизительно 1,5 раза, приблизительно 2 раза, приблизительно 2,5 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 3,5 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 4,5 раза, приблизительно

5 раз, приблизительно 5,5 раза, приблизительно 6 раз, приблизительно 6,5 раза, приблизительно 7 раз, приблизительно 7,5 раза, приблизительно 8 раз, приблизительно 8,5 раза, приблизительно 9 раз, приблизительно 9,5 раза, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз или приблизительно 100 раз, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) по сравнению с таковым в покоящихся нейронах.

[00124] В некоторых вариантах осуществления ген, ассоциированный с синдромом Ретта, экспрессируется в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах ЦНС в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза (например, приблизительно 1,5 раза, приблизительно 2 раза, приблизительно 2,5 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 3,5 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 4,5 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 5,5 раза, приблизительно 6 раз, приблизительно 6,5 раза, приблизительно 7 раз, приблизительно 7,5 раза, приблизительно 8 раз, приблизительно 8,5 раза, приблизительно 9 раз, приблизительно 9,5 раза, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз или приблизительно 100 раз, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) по сравнению с таковым в отличных от нейронов клетках организма.

[00125] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах ЦНС, чем в других нейронах, не относящихся к ЦНС, таких как нейроны периферической нервной системы (ПНС) организма. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена, ассоциированного с синдромом Ретта, не выявляется в нейронах ПНС. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, выше в нейронах ЦНС в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза (например, приблизительно 1,5 раза, приблизительно 2 раза, приблизительно 2,5 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 3,5 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 4,5 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 5,5 раза, приблизительно 6 раз, приблизительно 6,5 раза, приблизительно 7 раз, приблизительно 7,5 раза, приблизительно 8 раз, приблизительно 8,5 раза, приблизительно 9 раз, приблизительно 9,5 раза, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно

50 раз, приблизительно 60 раз, приблизительно 70 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 90 раз или приблизительно 100 раз, включая все значения и поддиапазоны, лежащие между ними) по сравнению с таковым в других нейронах, не относящихся к ЦНС, таких как нейроны периферической нервной системы (ПНС) организма.

[00126] Дозировки рекомбинантного вектора на основе AAV, подлежащие введению субъекту, зависят от способа введения, заболевания или состояния, подлежащего лечению и/или предупреждению, состояния каждого конкретного субъекта, конкретного вирусного вектора или капсида, нуклеиновой кислоты, подлежащей доставке, и т. п., и их можно определять обычным образом. Иллюстративными дозами для достижения терапевтических эффектов являются титры, составляющие по меньшей мере приблизительно 10^5 , приблизительно 10^6 , приблизительно 10^7 , приблизительно 10^8 , приблизительно 10^9 , приблизительно 10^{10} , приблизительно 10^{11} , приблизительно 10^{12} , приблизительно 10^{13} , приблизительно 10^{14} , приблизительно 10^{15} трансдуцирующих единиц, необязательно от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{13} трансдуцирующих единиц.

[00127] В конкретных вариантах осуществления можно использовать более одного введения (например, два, три, четыре или более введений) для достижения требуемого уровня экспрессии генов на протяжении периода времени с различными интервалами, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и т. д.

[00128] Иллюстративные способы введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, интраназальный, ингаляционный (например, посредством аэрозоля), буккальный (например, сублингвальный), вагинальный, интратекальный, внутриглазной, трансдермальный, внутриутробный (или *in ovo*), парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрикожный, внутримышечный [включая введение в скелетную, диафрагмальную и/или сердечную мышцу], внутрикожный, внутриплевральный, внутримозговой и внутрисуставный), местный (например, на поверхности и кожи, и слизистых, включая поверхности дыхательных путей, и трансдермальное введение), внутрилимфатический и т. п., а также прямую инъекцию в ткани или органы (например, в печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, мышцу диафрагмы или головной мозг). В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем инъекции в центральную нервную систему. Наиболее подходящий путь в каждом конкретном случае будет зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению и/или предупреждению, а также от природы конкретного вектора, который используется.

[00129] Доставка в ткань-мишень также может быть достигнута путем доставки средства-депо, содержащего вектор на основе вируса и/или капсид. В иллюстративных вариантах осуществления средство-депо, содержащее вирусный вектор и/или капсид, имплантируют в скелетную, сердечную и/или диафрагмальную мышечную ткань, или ткань может быть приведена в контакт с пленкой или другой матрицей, содержащей вирусный вектор и/или капсид.

[00130] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, могут включать введение субъекту терапевтически эффективного количества любых из нуклеиновых кислот, кассет экспрессии на основе AAV, плазмид, клеток, рекомбинантных векторов на основе AAV или композиций, раскрытых в данном документе, в комбинации с одной или более вторичных терапий, нацеленных на синдром Ретта. В некоторых вариантах осуществления способы лечения и/или задержки проявления по меньшей мере одного симптома синдрома Ретта у субъекта, раскрытые в данном документе, могут дополнительно включать введение одного или более вторичных терапий, нацеленных на синдром Ретта. В некоторых вариантах осуществления вторичная терапия предусматривает введение глатирамера ацетата. Более подробная информация о применении глатирамера ацетата представлена в Djukic A et al., *Pediatr Neurol*. 2016 Aug;61:51–7, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00131] В некоторых вариантах осуществления вторичная терапия предусматривает введение лекарственного средства для лечения судорог, введение лекарственного средства для лечения рефлюкса или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вторичная терапия предусматривает введение лекарственного средства для лечения судорог. Неограничивающие примеры лекарственных средств для лечения судорог включают леветирацетам, вальпроевую кислоту, окскарбазепин и ламотриджин. В некоторых вариантах осуществления вторичная терапия предусматривает введение лекарственного средства для лечения рефлюкса. Неограничивающие примеры лекарственных средств для лечения рефлюкса включают H₂-блокаторы, такие как циметидин, ранитидин, низатидин и фамотидин; ингибиторы протонной помпы, такие как омепразол, эзомепразол, лансопразол, рабепразол, пантопразол и декслансопразол; а также средства, стимулирующие перистальтику, такие как эритромицин в низких дозах, бензамид, домперидон и линаклотид.

[00132] Понятно, что используемый в данном документе термин введенный «в комбинации» означает, что два (или более) различных вида лечения доставляют субъекту

на протяжении поражения субъекта нарушением (таким как синдромом Ретта), так что эффекты видов лечения на пациента перекрываются в определенный момент времени. В определенных вариантах осуществления доставка одного вида лечения все еще осуществляется, когда начинается доставка второго, так что наблюдается перекрывание по срокам введения. В данном документе это иногда обозначается как «одновременная» или «параллельная» доставка. В других вариантах осуществления доставка одного вида лечения заканчивается перед началом доставки другого вида лечения, что может обозначаться как «последовательная» доставка.

[00133] В некоторых вариантах осуществления лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второй вид лечения является более эффективным; например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго вида лечения, или второй вид лечения уменьшает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы, если второй вид лечения вводился в отсутствие первого вида лечения, или аналогичная ситуация наблюдается при первом виде лечения. Эффект от двух видов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышать аддитивный (синергическим).

[00134] Все документы, публикации и патенты, процитированные в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы было указано, что каждый отдельный документ, публикация или патент конкретно и индивидуально включены посредством ссылки, и включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются данные публикации. Однако, упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, патентной публикации и патентной заявки, цитируемых в данном документе, не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения, что они составляют имеющий юридическую силу уровень техники или образуют часть общеизвестных знаний в какой-либо стране мира.

[00135] Если контекст не указывает на иное, конкретно подразумевается, что различные признаки, описанные в данном документе, могут быть использованы в любой комбинации.

[00136] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалисту средне квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[00137] Следует понимать, что приведенное выше описание, а также следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в рамках объема настоящего изобретения будут очевидны специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

[00138] Следующие примеры, которые включены в данный документ исключительно в целях иллюстрации, не являются ограничивающими.

Пример 1. Получение кассет экспрессии на основе AAV

[00139] Три кассеты экспрессии на основе AAV, содержащие зависимый от активности промотор hSARE-hArcMin (SEQ ID NO: 6) и ген BDNF (SEQ ID NO: 7), фланкированные 5' ITR (SEQ ID NO: 1) и 3' ITR (SEQ ID NO: 2), создавали с использованием стандартных методик клонирования. См. фиг. 1–3, демонстрирующие схематическое изображение трех кассет. Первая кассета содержит короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13). Вторая кассета содержит полиА-сигнал bGH (SEQ ID NO: 9) и спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 13). Третья кассета содержит длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10). Три кассеты экспрессии на основе AAV содержат последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 (фиг. 1), SEQ ID NO: 4 (фиг. 2) и SEQ ID NO: 5 (фиг. 3) соответственно.

Пример 2. Получение рекомбинантных векторов на основе AAV в клетках млекопитающих

[00140] Каждую из трех кассет экспрессии на основе AAV включают в плазмиду с получением трех плазмид, содержащих каждую из трех кассет экспрессии на основе AAV. Каждой из трех плазмид трансфицируют продуцирующие вирусы клетки (например, HEK293) с использованием соответствующего реагента для трансфекции (например, LipofectamineTM), вместе с плазмидой Rep/Cap, кодирующей гены Rep и Cap, и хелперной плазмидой, содержащей различные хелперные последовательности, необходимые для продуцирования AAV (E4, E2a и VA). После инкубации при 37°C в течение заранее определенного периода времени частицы AAV собирают из среды или клетки лизируют для высвобождения частиц AAV. Затем частицы AAV очищают и титруют, и их можно хранить при -80°C для последующего применения.

Пример 3. Получение рекомбинантных векторов на основе AAV в клетках насекомых

[00141] Каждую из трех кассет экспрессии на основе AAV включают в бакуловирусный вектор с получением трех бакуловирусных векторов, содержащих каждую из трех кассет экспрессии на основе AAV. Клетки насекомых (например, Sf9) инфицируют совместно в суспензионной культуре каждым из трех бакуловирусных векторов и по меньшей мере одним дополнительным рекомбинантным бакуловирусным вектором, содержащим последовательности, кодирующие белки Rep и Cap AAV. После инкубации при 28°C в течение заранее определенного периода времени частицы AAV собирают из среды или клетки лизируют для высвобождения частиц AAV. Затем частицы AAV очищают и титруют, и их можно хранить при -80°C для последующего применения.

Пример 4. Промотор hSARE-hArcMin управляет экспрессией зависимого от активности репортерного гена

[00142] Чтобы протестировать, способен ли промотор hSARE-hArcMin управлять экспрессией генов в зависимости от нейронной активности, проводили следующие эксперименты.

[00143] Кассеты экспрессии на основе AAV, содержащие конститутивный промотор, который управляет долговременной экспрессией в нейронах (hSyn; промотор гена синапсина 1 человека, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38), или зависимый от активности промотор (hSARE-hArcMin, SEQ ID NO: 6), создавали с использованием стандартных методик клонирования (см. таблицу 3). На фиг. 4, 9A–9C, 10A–10C и 11A–11C показано схематическое изображение этих кассет. Кассеты содержат одну из следующих последовательностей 3' UTR: короткую 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 8), полиА-сигнал bGH (обозначаемый как «bGHpA» или «bGH», SEQ ID NO: 9) или длинную 3' UTR BDNF (SEQ ID NO: 10). Кассеты также содержат репортерный ген, функционально связанный с конститутивным или зависимым от активности промотором. Репортерный ген кодирует либо мономерный красный флуоресцентный белок (mScarlet, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 36), либо дестабилизированную версию mScarlet (dmScarlet, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 35). Дестабилизированная версия mScarlet содержит С-концевой дегрон-сигнал PEST (кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37), который стимулирует более высокую скорость обмена под воздействием протеасомной деградации по сравнению с mScarlet. Следовательно, флуоресценция dmScarlet накапливается в клетке в меньшей степени, чем флуоресценция mScarlet.

Таблица 3. Кассеты экспрессии для экспрессии репортерного гена

№ конструкции	Название конструкции	SEQ ID NO:	Схематическое представление	Промотор	Репортерный ген	Последовательность ниже кодирующей области
1	C-mScar-короткая UTR	26	Фиг. 9А	hSyn (конститутивный или «С»)	mScarlet-I (mScar)	Короткая 3' UTR
2	C-mScar-длинная UTR	27	Фиг. 9В	hSyn (конститутивный или «С»)	mScarlet-I (mScar)	Длинная 3' UTR
3	C-mScar-bGH	28	Фиг. 9С	hSyn (конститутивный или «С»)	mScarlet-I (mScar)	bGHpA
4	C-dmScar-короткая UTR	26	Фиг. 10А	hSyn (конститутивный или «С»)	dmScarlet-I (dmScar)	Короткая 3' UTR
5	C-dmScar-длинная UTR	27	Фиг. 10В	hSyn (конститутивный или «С»)	dmScarlet-I (dmScar)	Длинная 3' UTR
6	C-dmScar-bGH	28	Фиг. 10С	hSyn (конститутивный или «С»)	dmScarlet-I (dmScar)	bGHpA
7	AD-dmScar-короткая UTR	32	Фиг. 11А	hSARE-hArcMin (зависимый от активности или «AD»)	dmScarlet-I (dmScar)	Короткая 3' UTR
8	AD-dmScar-длинная UTR	33	Фиг. 11В	hSARE-hArcMin (зависимый от активности или «AD»)	dmScarlet-I (dmScar)	Длинная 3' UTR
9	AD-dmScar-bGH	34	Фиг. 11С	hSARE-hArcMin (зависимый от активности или «AD»)	dmScarlet-I (dmScar)	bGHpA

[00144] Рекомбинантные векторы на основе AAV, содержащие кассеты экспрессии на основе AAV 1, 2, 3, 7, 8 и 9, перечисленные в таблице 3, получали, как описано в данном документе. Первичные нейроны мыши дикого типа трансдуцировали каждым из этих рекомбинантных векторов на основе AAV. Трансдуцированные клетки обрабатывали с помощью 2 мкМ ингибитора натриевых каналов, тетродотоксина (ТТХ), на протяжении ночи. Обработка с помощью ТТХ ингибирует нейронную активность. После этого среду полностью аспирировали и заменяли любым из следующего: (а) только среда, (б) среда + ТТХ, (в) среда + 150 мМ КСl или (г) среда + 30 мкМ бикикулина (ВlС). В то время как КСl деполаризует нейроны, ВlС является конкурентным антагонистом рецептора γ -аминомасляной кислоты типа А (GABA_A) и индуцирует растормаживание нейронов. Следовательно, обработка нейронов либо КСl, либо ВlС стимулирует нейронную активность. Контрольные нейроны, помещенные в только среду (в соответствии с обработкой (а) выше), не ингибируются и не активируются, а находятся в состоянии покоя, в то время как активность нейронов, помещенных в среду, содержащую ТТХ (в соответствии с обработкой (б) выше), ингибируется. Далее клетки инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Затем клетки фиксировали и окрашивали с помощью Hoescht 33342, а также визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа.

[00145] На фиг. 5А показана флуоресценция репортерного белка в клетках, которые не обрабатывали с помощью ТТХ (то есть в клетках, в которых нейронная активность не стимулируется и не ингибируется), относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ ТТХ, которую нормализовали до 1. Как показано на фиг. 5А, когда нейронная активность не стимулируется и не ингибируется, относительная флуоресценция клеток, трансдуцированных векторами на основе AAV, которые управляют экспрессией dmScarlet с использованием промотора hSARE-hArcMin, сопоставима с относительной флуоресценцией клеток, трансдуцированных векторами на основе AAV, которые управляют экспрессией dmScarlet с использованием конститутивного промотора hSyn.

[00146] На фиг. 5В показана флуоресценция репортерного белка в клетках, которые не обрабатывали с помощью ТТХ, а вместо этого обрабатывали с помощью 150 мМ КСl (то есть в клетках, в которых нейронная активность стимулируется), относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ ТТХ, которая нормализована до 1. На фиг. 5С показана флуоресценция репортерного белка в клетках, которые не обрабатывали с помощью ТТХ, а вместо этого обрабатывали с помощью 30 мкМ бикикулина (ВlС) (то есть в клетках, в которых нейронная активность стимулируется),

относительно флуоресценции в клетках, обработанных с помощью 2 мкМ ТТХ, которая нормализована до 1.

[00147] Как показано на фиг. 5B и 5C, когда нейронная активность стимулируется с использованием обработки KCl или BIC, относительная флуоресценция клеток, трансдуцированных векторами на основе AAV, которые управляют экспрессией dmScarlet с использованием зависимого от активности промотора hSARE-hArcMin, выше, чем относительная флуоресценция клеток, трансдуцированных векторами на основе AAV, которые управляют экспрессией dmScarlet с использованием конститутивного промотора (hSyn).

[00148] Эти результаты демонстрируют, что промотор hSARE-hArcMin способен управлять экспрессией генов в зависимости от нейронной активности. Кроме того, конструкции dmScarlet, содержащие bGH или длинную 3' UTR, сходным образом экспрессировались под действием промотора hSARE-hArcMin, как показано на фиг. 5B и 5C.

[00149] Зависимая от активности экспрессия промотора hSARE-hArcMin дополнительно проиллюстрирована на фиг. 6A-B. Как показано на фиг. 6A, конститутивный промотор hSyn управляет высокими уровнями экспрессии mScarlet, независимо от присутствия ТТХ. Поразительно, но на фиг. 6B показано, что когда клетки не обрабатывают с помощью ТТХ, а вместо этого обрабатывают с помощью 30 мкМ BIC для стимуляции нейронной активности, промотор hSARE-hArcMin управляет высокими уровнями экспрессии репортерного гена. Примечательно, что на фиг. 6B показано, что конструкция экспрессии на основе AAV, содержащая промотор hSARE-hArcMin в комбинации с длинной 3' UTR, приводит к приблизительно 5-кратному повышению уровня экспрессии dmScarlet в присутствии ТТХ, по сравнению с конструкцией экспрессии на основе AAV, содержащей промотор hSARE-hArcMin в комбинации bGHpA. Эти результаты дополнительно демонстрируют зависимую от нейронной активности индукцию промотора hSARE-hArcMin.

[00150] Для определения субклеточной локализации и уровней экспрессированного флуоресцентного белка нейроны, экспрессирующие репортерный ген под управлением конститутивного промотора hSyn или зависимого от активности промотора hSARE-hArcMin, наблюдали с использованием микроскопии.

[00151] Как показано на фиг. 7, клетки, экспрессирующие mScarlet с использованием конститутивного промотора hSyn, были флуоресцентными, однако

уровень флуоресценции варьировался в зависимости от области 3' UTR или сигнала полиаденилирования в cassette экспрессии. Например, cassette экспрессии, содержащие длинную 3' UTR, приводили к более высоким уровням экспрессии гена mScarlet, за ними следовали cassette экспрессии, содержащие короткую 3' UTR. Cassette экспрессии, содержащие короткую 3' UTR, приводили к значительно более низким уровням экспрессии гена mScarlet. В отличие от этого, экспрессия репортерного белка под управлением зависимого от активности промотора hSARE-hArcMin не варьировалась в зависимости от типа используемой 3' UTR. В частности, на фиг. 5 и 6 показано, что конструкции экспрессии на основе AAV, содержащие промотор hSARE-hArcMin в комбинации с bGHpA или длинной 3' UTR, приводили к сходным уровням экспрессии dmScarlet в присутствии нейронной активности.

[00152] Кроме того, на фиг. 7 показано, что субклеточная локализация mScarlet, экспрессируемого с помощью конститутивного промотора, варьируется в зависимости от области 3' UTR или сигнала полиаденилирования в cassette экспрессии. В то время как cassette экспрессии, содержащие длинную 3' UTR и bGHpA, приводили к экспрессии mScarlet в теле клетки и нейритах, cassette экспрессии, содержащие короткую 3' UTR, приводили к экспрессии mScarlet только в теле клетки.

[00153] Как показано на фиг. 8 и 12 конструкции экспрессии на основе AAV, содержащие промотор hSARE-hArcMin в комбинации с bGHpA (фиг. 8) или длинной 3' UTR (фиг. 12), приводили к сходным уровням экспрессии dmScarlet в присутствии нейронной активности. Кроме того, клетки, экспрессирующие dmScarlet с использованием зависимого от активности промотора hSARE-hArcMin, показали сигнал флуоресценции в теле клетки и нейритах после нейронной активации (в отсутствие TTX и в присутствии BIC).

[00154] В целом, описанные выше результаты показывают, что синтетический промотор hSARE-hArcMin стимулирует более высокие уровни экспрессии генов в нейронах, которые являются активными, по сравнению с нейронами, которые являются ингибированными или покоящимися. Следовательно, синтетический промотор hSARE-hArcMin может использоваться для управления зависимой от нейронной активности экспрессии любого гена-мишени, такого как ген, ассоциированный с синдромом Ретта, описанный в данном документе.

Пример 5. Определение характеристик cassette экспрессии на основе AAV, содержащих BDNF

[00155] Частицы AAV, созданные в примере 2 или 3, вводят путем инъекции мутантным по *mesp2* мышам, у которых проявляются симптомы, сходные с синдромом Ретта, чтобы протестировать, уменьшает ли экспрессия BDNF с использованием зависимого от активности промотора hSARE-hArcMin, тяжесть одного или более симптомов. Также тестировали способность зависимой от активности экспрессии BDNF отсрочить проявление симптомов синдрома Ретта у новорожденных мутантных по *mesp2* мышей.

[00156] Вышеизложенное является иллюстрацией настоящего изобретения и не должно рассматриваться как его ограничение.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00157] Следующий перечень вариантов осуществления включен в данный документ исключительно в иллюстративных целях и не предполагает то, что он является исчерпывающим или ограничивающим. Заявляемый объект в явной форме не ограничивается следующими вариантами осуществления.

Вариант осуществления 1. Нуклеиновая кислота, содержащая кассету экспрессии на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где кассета экспрессии на основе AAV содержит в направлении от 5' до 3'

5' инвертированный концевой повтор (ITR);

синтетический зависимый от активности промотор;

ген, ассоциированный с синдромом Ретта, и

3' ITR.

Вариант осуществления 2. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 1, где промотор управляет экспрессией гена, ассоциированного с синдромом Ретта.

Вариант осуществления 3. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 1 или 2, где промотор представляет собой МЕСР2-независимый промотор.

Вариант осуществления 4. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–3, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора непосредственно-раннего гена нейронов.

Вариант осуществления 5. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 4, где непосредственно-ранний ген нейронов выбран из группы, состоящей из гена Arc, гена c-fos и гена egr-1.

Вариант осуществления 6. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–5, где промотор содержит минимальный промотор гена Arc (ArcMin).

Вариант осуществления 7. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 6, где ArcMin представляет собой ArcMin человека (hArcMin).

Вариант осуществления 8. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 7, где hArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 9. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–8, где промотор содержит элемент ответа на циклический АМФ (CRE), элемент ответа на сыворотку (SRE), элемент ответа на синаптическую активность (SARE), элемент ответа на MEF2 или их комбинацию.

Вариант осуществления 10. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 9, где промотор содержит элемент ответа на синаптическую активность (SARE).

Вариант осуществления 11. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 10, где элемент ответа на синаптическую активность (SARE) представляет собой элемент ответа на синаптическую активность человека (hSARE).

Вариант осуществления 12. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 11, где hSARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 13. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–12, где промотор содержит ArcMin человека (hArcMin) и по меньшей мере один hSARE.

Вариант осуществления 14. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 13, где промотор содержит hArcMin и один hSARE.

Вариант осуществления 15. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 14, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 16. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 13, где промотор содержит hArcMin и пять hSARE.

Вариант осуществления 17. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 16, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 18. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–17, где промотор связывается с зависимым от нейронной активности фактором транскрипции.

Вариант осуществления 19. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 18, где зависимый от нейронной активности фактор транскрипции представляет собой белок, связывающий отвечающий на цАМФ элемент (CREB), фактор усиления миоцитов 2 (MEF2), фактор ответа на сыворотку (SRF) или Elk-1.

Вариант осуществления 20. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–19, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), метил-СрG-связывающий белок 2 (MECP2), белок хантингтин, ассоциированный с болезнью Хантингтона белок 1, гомеобокс 2 Orthodenticle (OTX-2), регулятор ионного транспорта 1, содержащий FXYD-домен (FXYD1), нейрексин-2-альфа (NRXN2) или гамма-субъединицу протеинкиназы C (PRKCG).

Вариант осуществления 21. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 20, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).

Вариант осуществления 22. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 21, где BDNF представляет собой BDNF человека.

Вариант осуществления 23. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 22, где BDNF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7 или последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 24. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–23, где длина по меньшей мере одного из 5' ITR и 3' ITR составляет от приблизительно 110 до приблизительно 160 нуклеотидов.

Вариант осуществления 25. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–24, где 5' ITR имеет такую же длину, что и 3' ITR.

Вариант осуществления 26. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–24, где 5' ITR и 3' ITR имеют разную длину.

Вариант осуществления 27. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–26, где по меньшей мере один из 5' ITR и 3' ITR выделен или получен из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота.

Вариант осуществления 28. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–23, где 5' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 29. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–23, где 3' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 30. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–29, где кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) или длинную 3' UTR BDNF.

Вариант осуществления 31. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 30, где короткая 3' UTR BDNF или длинная 3' UTR BDNF располагается между геном, ассоциированным с синдромом Ретта, и 3' ITR.

Вариант осуществления 32. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 30 или варианту осуществления 31, где кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR BDNF.

Вариант осуществления 33. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 32, где короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 34. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 30 или варианту осуществления 31, где кассета на основе AAV содержит длинную 3' UTR BDNF.

Вариант осуществления 35. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 34, где длинная 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 36. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–35, где кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования.

Вариант осуществления 37. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 36, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования, выделенный или полученный из одного или более из следующих генов: гена вируса обезьян 40 (SV40), гВГ, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) или гормона роста крупного рогатого скота (bGH).

Вариант осуществления 38. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 36, где кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования bGH.

Вариант осуществления 39. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 38, где сигнал полиаденилирования bGH содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 40. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–39, где кассета на основе AAV содержит по меньшей мере одну спейсерную последовательность.

Вариант осуществления 41. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 40, где по меньшей мере одна спейсерная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 42. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–41, где кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность Козак, где последовательность Козак перекрывается со старт-кодоном гена, ассоциированного с синдромом Ретта.

Вариант осуществления 43. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 42, где последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 44. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 1–43, где кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая на по меньшей мере

мере 90% идентична ей; SEQ ID NO: 4 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или SEQ ID NO: 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

Вариант осуществления 45. Плазмида, содержащая нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления 1–44.

Вариант осуществления 46. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления 1–44 или плазмиду согласно варианту осуществления 45.

Вариант осуществления 47. Способ получения рекомбинантного вектора на основе AAV, при этом способ включает приведение клетки-продуцента AAV в контакт с нуклеиновой кислотой согласно любому из вариантов осуществления 1–44 или плазмидой согласно варианту осуществления 45.

Вариант осуществления 48. Рекомбинантный вектор на основе AAV, полученный с помощью способа согласно варианту осуществления 47.

Вариант осуществления 49. Рекомбинантный вектор на основе AAV согласно варианту осуществления 48, где вектор происходит из серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц и AAV крупного рогатого скота.

Вариант осуществления 50. Рекомбинантный вектор на основе AAV согласно варианту осуществления 48 или варианту осуществления 49, где рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой однонитевой AAV (ssAAV).

Вариант осуществления 51. Рекомбинантный вектор на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–50, где рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой самокомплементарный AAV (scAAV).

Вариант осуществления 52. Рекомбинантный вектор на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–51, где вектор на основе AAV содержит капсидный белок из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота.

Вариант осуществления 53. Рекомбинантный вектор на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–52, где вектор на основе AAV содержит капсидный

белок с одной или более заменами или мутациями по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа.

Вариант осуществления 54. Композиция, содержащая (а) нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиду согласно варианту осуществления 45, клетку согласно варианту осуществления 46 или рекомбинантный вектор на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 55. Способ экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиды согласно варианту осуществления 45, клетки согласно варианту осуществления 46, рекомбинантного вектора на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 или композиции согласно варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 56. Способ согласно варианту осуществления 55, где у субъекта имеется синдром Ретта.

Вариант осуществления 57. Способ лечения или задержки проявления синдрома Ретта у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиды согласно варианту осуществления 45, клетки согласно варианту осуществления 46, рекомбинантного вектора на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 или композиции согласно варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 58. Способ экспрессии нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиды согласно варианту осуществления 45, клетки согласно варианту осуществления 46, рекомбинантного вектора на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 или композиции согласно варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 59. Способ согласно варианту осуществления 58, где у субъекта имеется когнитивное нарушение или обусловленное стрессом нарушение.

Вариант осуществления 60. Способ согласно варианту осуществления 58, где у субъекта имеется депрессия, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь

Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменция, нервная анорексия и нервная булимия, шизофрения, эпилепсия, посттравматическое стрессовое расстройство, ожирение, синдром Ретта или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

Вариант осуществления 61. Способ лечения или задержки проявления ассоциированного с BDNF заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиды согласно варианту осуществления 45, клетки согласно варианту осуществления 46, рекомбинантного вектора на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 или композиции согласно варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 62. Способ согласно варианту осуществления 61, где ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой когнитивное нарушение и/или обусловленное стрессом нарушение.

Вариант осуществления 63. Способ согласно варианту осуществления 61, где ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой депрессию, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменцию, нервную анорексию, нервную булимию, шизофрению, эпилепсию, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное заболевание, синдром Ретта, большое депрессивное расстройство или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

Вариант осуществления 64. Способ лечения или задержки проявления ассоциированного с MECP2 заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1–44, плазмиды согласно варианту осуществления 45, клетки согласно варианту осуществления 46, рекомбинантного вектора на основе AAV согласно любому из вариантов осуществления 48–53 или композиции согласно варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 65. Способ согласно варианту осуществления 64, где ассоциированное с MECP2 заболевание представляет собой синдром дупликации MECP2, тяжелую неонатальную энцефалопатию, связанную с MECP2, синдром PPM-X или синдром Ретта.

Вариант осуществления 66. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55–65, где субъект представляет собой субъекта-человека.

Вариант осуществления 67. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55–66, где нуклеиновую кислоту, плазмиду, клетку, рекомбинантный вектор на основе AAV или композицию вводят путем инъекции в центральную нервную систему.

Вариант осуществления 68. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55–67, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, экспрессируется в нейронах субъекта.

Вариант осуществления 69. Способ согласно варианту осуществления 68, где нейроны представляют собой активные нейроны.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, содержащая кассету экспрессии на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где кассета экспрессии на основе AAV содержит в направлении от 5' до 3'

5' инвертированный концевой повтор (ITR);

синтетический зависимый от активности промотор;

ген, ассоциированный с синдромом Ретта, и

3' ITR.

2. Нуклеиновая кислота по п. 1, где промотор управляет экспрессией гена, ассоциированного с синдромом Ретта.

3. Нуклеиновая кислота по п. 1 или п. 2, где промотор представляет собой МЕСР2-независимый промотор.

4. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–3, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из промотора непосредственно-раннего гена нейронов.

5. Нуклеиновая кислота по п. 4, где непосредственно-ранний ген нейронов выбран из группы, состоящей из гена *Arc*, гена *c-fos* и гена *egr-1*.

6. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–5, где промотор содержит минимальный промотор гена *Arc* (ArcMin).

7. Нуклеиновая кислота по п. 6, где ArcMin представляет собой ArcMin человека (hArcMin).

8. Нуклеиновая кислота по п. 7, где hArcMin содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 12 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

9. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–8, где промотор содержит элемент ответа на циклический АМФ (CRE), элемент ответа на сыворотку (SRE), элемент ответа на синаптическую активность (SARE), элемент ответа на MEF2 или их комбинацию.

10. Нуклеиновая кислота по п. 9, где промотор содержит элемент ответа на синаптическую активность (SARE).

11. Нуклеиновая кислота по п. 10, где элемент ответа на синаптическую активность (SARE) представляет собой элемент ответа на синаптическую активность человека (hSARE).

12. Нуклеиновая кислота по п. 11, где hSARE содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

13. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–12, где промотор содержит ArgMin человека (hArgMin) и по меньшей мере один hSARE.

14. Нуклеиновая кислота по п. 13, где промотор содержит hArgMin и один hSARE.

15. Нуклеиновая кислота по п. 14, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

16. Нуклеиновая кислота по п. 13, где промотор содержит hArgMin и пять hSARE.

17. Нуклеиновая кислота по п. 16, где промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 16 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

18. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–17, где промотор связывается с зависимым от нейронной активности фактором транскрипции.

19. Нуклеиновая кислота по п. 18, где зависимый от нейронной активности фактор транскрипции представляет собой белок, связывающий отвечающий на цАМФ элемент (CREB), фактор усиления миоцитов 2 (MEF2), фактор ответа на сыворотку (SRF) или Elk-1.

20. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–19, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), метил-CpG-связывающий белок 2 (MECP2), белок хантингтин, ассоциированный с болезнью Хантингтона белок 1, гомеобокс 2 Orthodenticle (OTX-2), регулятор ионного транспорта 1, содержащий FXYD-домен (FXYD1), нейрексин-2-альфа (NRXN2) или гамма-субъединицу протеинкиназы C (PRKCG).

21. Нуклеиновая кислота по п. 20, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, кодирует нейротрофический фактор головного мозга (BDNF).

22. Нуклеиновая кислота по п. 21, где BDNF представляет собой BDNF человека.
23. Нуклеиновая кислота по п. 22, где BDNF кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7 или последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.
24. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–23, где длина по меньшей мере одного из 5' ITR и 3' ITR составляет от приблизительно 110 до приблизительно 160 нуклеотидов.
25. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–24, где 5' ITR имеет такую же длину, что и 3' ITR.
26. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–24, где 5' ITR и 3' ITR имеют разную длину.
27. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–26, где по меньшей мере один из 5' ITR и 3' ITR выделен или получен из генома AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота.
28. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–23, где 5' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.
29. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–23, где 3' ITR содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.
30. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–29, где кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) или длинную 3' UTR BDNF.
31. Нуклеиновая кислота по п. 30, где короткая 3' UTR BDNF или длинная 3' UTR BDNF располагается между геном, ассоциированным с синдромом Ретта, и 3' ITR.
32. Нуклеиновая кислота по п. 30 или п. 31, где кассета на основе AAV содержит короткую 3' UTR BDNF.
33. Нуклеиновая кислота по п. 32, где короткая 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.
34. Нуклеиновая кислота по п. 30 или п. 31, где кассета на основе AAV содержит длинную 3' UTR BDNF.

35. Нуклеиновая кислота по п. 34, где длинная 3' UTR BDNF содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 10 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

36. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–35, где кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования.

37. Нуклеиновая кислота по п. 36, где сигнал полиаденилирования представляет собой сигнал полиаденилирования, выделенный или полученный из одного или более из следующих генов: гена вируса обезьян 40 (SV40), гBG, α -глобина, β -глобина, коллагена человека, гормона роста человека (hGH), вируса полиомы, гормона роста человека (hGH) или гормона роста крупного рогатого скота (bGH).

38. Нуклеиновая кислота по п. 36, где кассета на основе AAV содержит сигнал полиаденилирования bGH.

39. Нуклеиновая кислота по п. 38, где сигнал полиаденилирования bGH содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

40. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–39, где кассета на основе AAV содержит по меньшей мере одну спейсерную последовательность.

41. Нуклеиновая кислота по п. 40, где по меньшей мере одна спейсерная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

42. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–41, где кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность Козак, где последовательность Козак перекрывается со старт-кодоном гена, ассоциированного с синдромом Ретта.

43. Нуклеиновая кислота по п. 42, где последовательность Козак содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

44. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1–43, где кассета экспрессии на основе AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; SEQ ID NO: 4 или

последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей; или SEQ ID NO: 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

45. Плазмида, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1–44.
46. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1–44 или плазмиду по п. 45.
47. Способ получения рекомбинантного вектора на основе AAV, при этом способ включает приведение клетки-продуцента AAV в контакт с нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1–44 или плазмидой по п. 45.
48. Рекомбинантный вектор на основе AAV, полученный с помощью способа по п. 47.
49. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п. 48, где вектор происходит из серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц и AAV крупного рогатого скота.
50. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п. 48 или п. 49, где рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой односторонний AAV (ssAAV).
51. Рекомбинантный вектор на основе AAV по любому из пп. 48–50, где рекомбинантный вектор на основе AAV представляет собой самокомплементарный AAV (scAAV).
52. Рекомбинантный вектор на основе AAV по любому из пп. 48–51, где вектор на основе AAV содержит капсидный белок из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV птиц или AAV крупного рогатого скота.
53. Рекомбинантный вектор на основе AAV по любому из пп. 48–52, где вектор на основе AAV содержит капсидный белок с одной или более заменами или мутациями по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа.
54. Композиция, содержащая (a) нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1–44, плазмиду по п. 45, клетку по п. 46 или рекомбинантный вектор на основе AAV по любому из пп. 48–53 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.
55. Способ экспрессии гена, ассоциированного с синдромом Ретта, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–44, плазмиды по п. 45, клетки по

п. 46, рекомбинантного вектора на основе AAV по любому из пп. 48–53 или композиции по п. 54.

56. Способ по п. 55, где у субъекта имеется синдром Ретта.

57. Способ лечения или задержки проявления синдрома Ретта у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–44, плазмиды по п. 45, клетки по п. 46, рекомбинантного вектора на основе AAV по любому из пп. 48–53 или композиции по п. 54.

58. Способ экспрессии нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–44, плазмиды по п. 45, клетки по п. 46, рекомбинантного вектора на основе AAV по любому из пп. 48–53 или композиции по п. 54.

59. Способ по п. 58, где у субъекта имеется когнитивное нарушение или обусловленное стрессом нарушение.

60. Способ по п. 58, где у субъекта имеется депрессия, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменция, нервная анорексия и нервная булимия, шизофрения, эпилепсия, посттравматическое стрессовое расстройство, ожирение, синдром Ретта или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

61. Способ лечения или задержки проявления ассоциированного с BDNF заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–44, плазмиды по п. 45, клетки по п. 46, рекомбинантного вектора на основе AAV по любому из пп. 48–53 или композиции по п. 54.

62. Способ по п. 61, где ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой когнитивное нарушение и/или обусловленное стрессом нарушение.

63. Способ по п. 61, где ассоциированное с BDNF заболевание представляет собой депрессию, обсессивно-компульсивное расстройство, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и деменцию, нервную анорексию, нервную булимию, шизофрению, эпилепсию, посттравматическое стрессовое расстройство, биполярное заболевание, синдром Ретта, большое депрессивное расстройство или нарушение когнитивных функций после химиотерапии.

64. Способ лечения или задержки проявления ассоциированного с МЕСР2 заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–44, плазмиды по п. 45, клетки по п. 46, рекомбинантного вектора на основе AAV по любому из пп. 48–53 или композиции по п. 54.

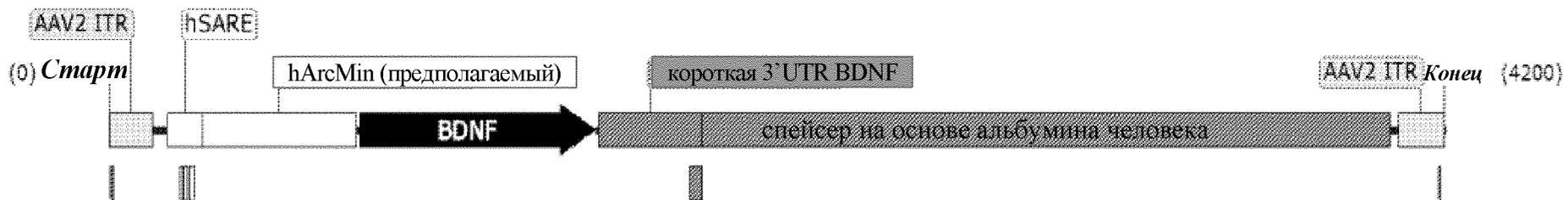
65. Способ по п. 64, где ассоциированное с МЕСР2 заболевание представляет собой синдром дупликации МЕСР2, тяжелую неонатальную энцефалопатию, связанную с МЕСР2, синдром PPM-X или синдром Ретта.

66. Способ по любому из пп. 55–65, где субъект представляет собой субъекта-человека.

67. Способ по любому из пп. 55–66, где нуклеиновую кислоту, плазмиду, клетку, рекомбинантный вектор на основе AAV или композицию вводят путем инъекции в центральную нервную систему.

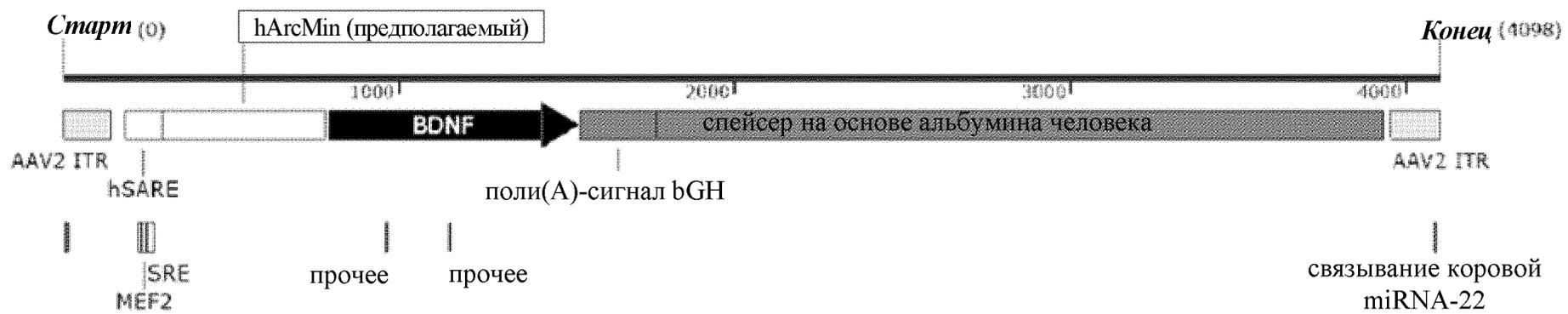
68. Способ по любому из пп. 55–67, где ген, ассоциированный с синдромом Ретта, экспрессируется в нейронах субъекта.

69. Способ по п. 68, где нейроны представляют собой активные нейроны.



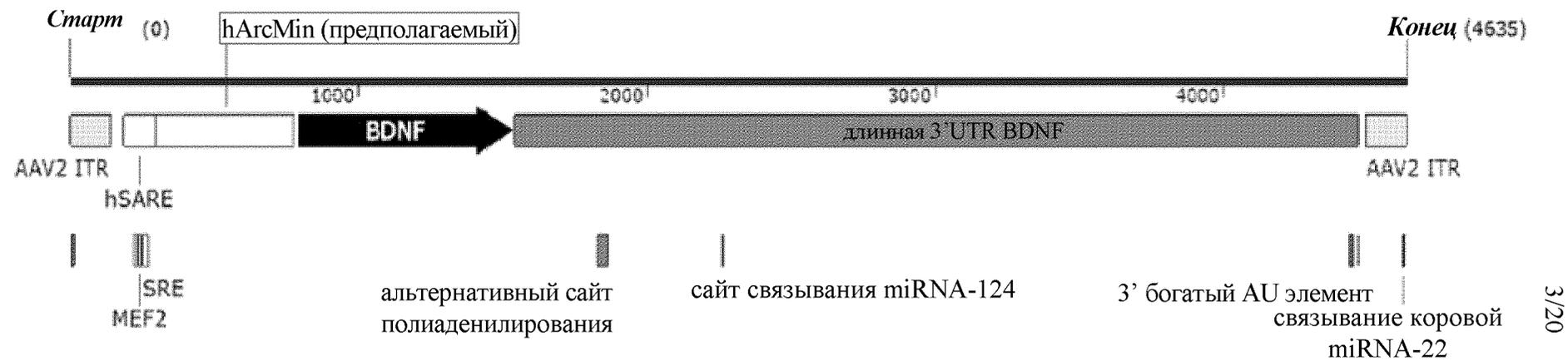
pTR141-hSARE-ArcMin-BDNF-короткая 3'UTR (AAV2 ITR – AAV2 ITR)
4200 п. о.

Фиг. 1



pTR141-hSARE-ArcMin-BDNF-bGH-hAlb (AAV2 ITR – AAV2 ITR)
4098 п. о.

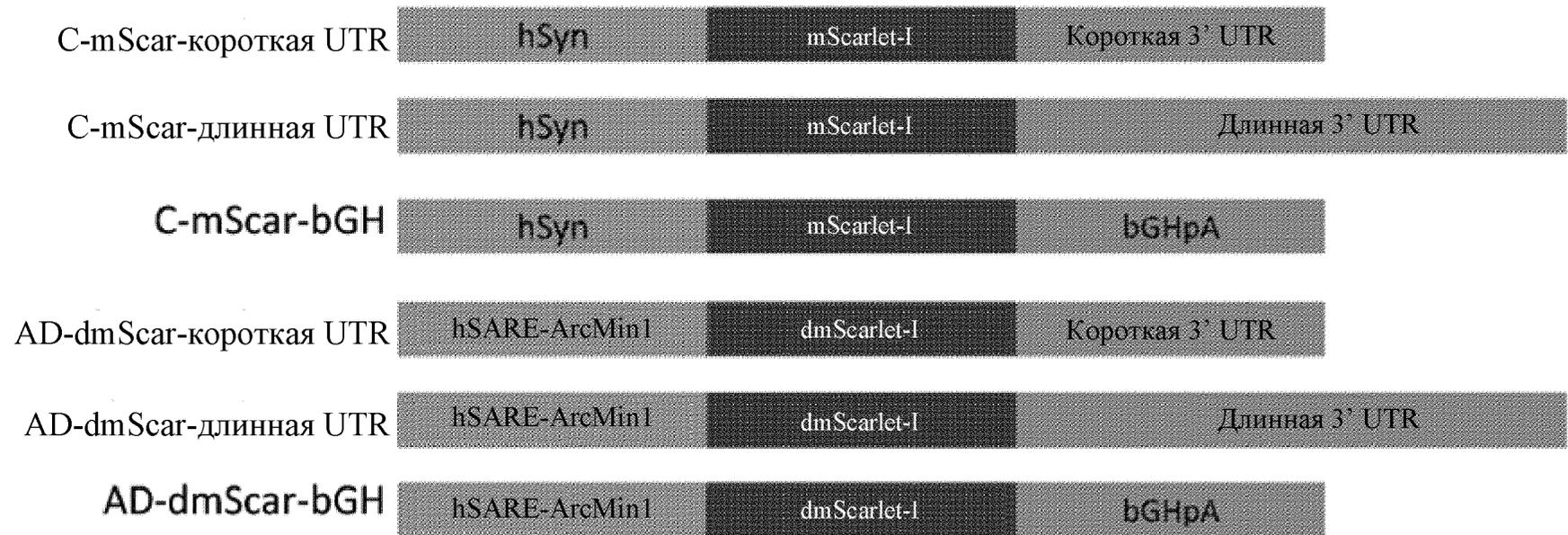
Фиг. 2



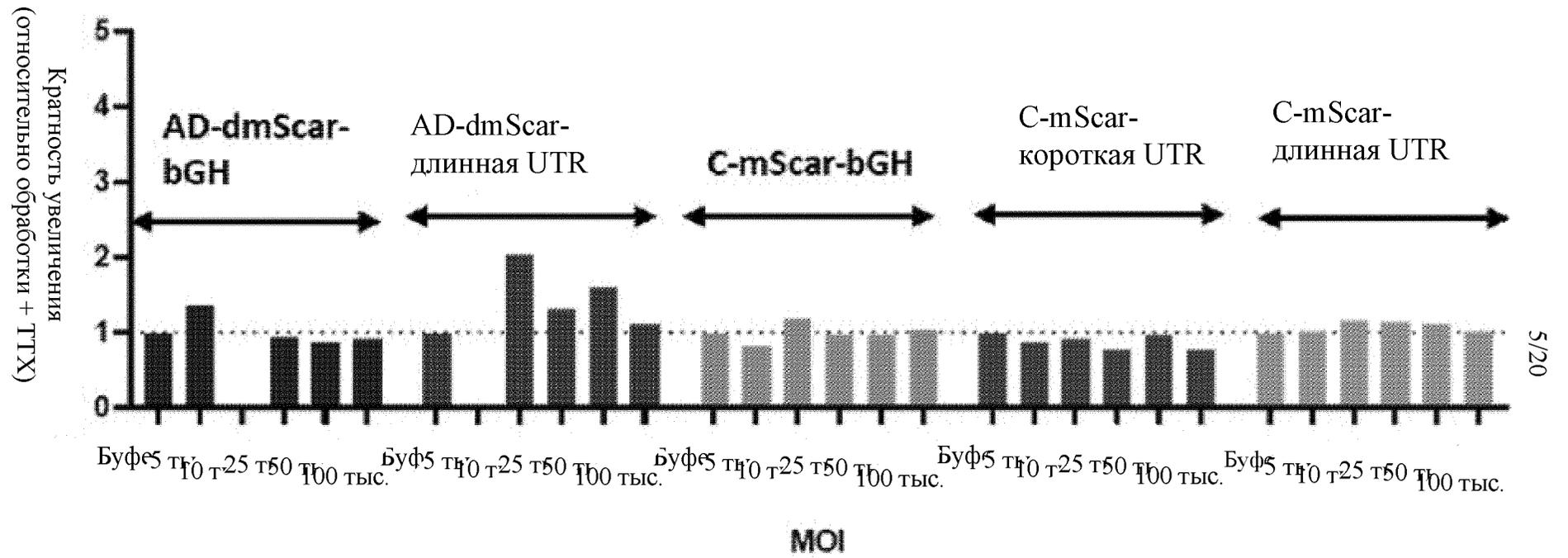
pTR141-hSARE-ArcMin-BDNF-3'UTR (AAV2 ITR – AAV2 ITR)

4635 п. о.

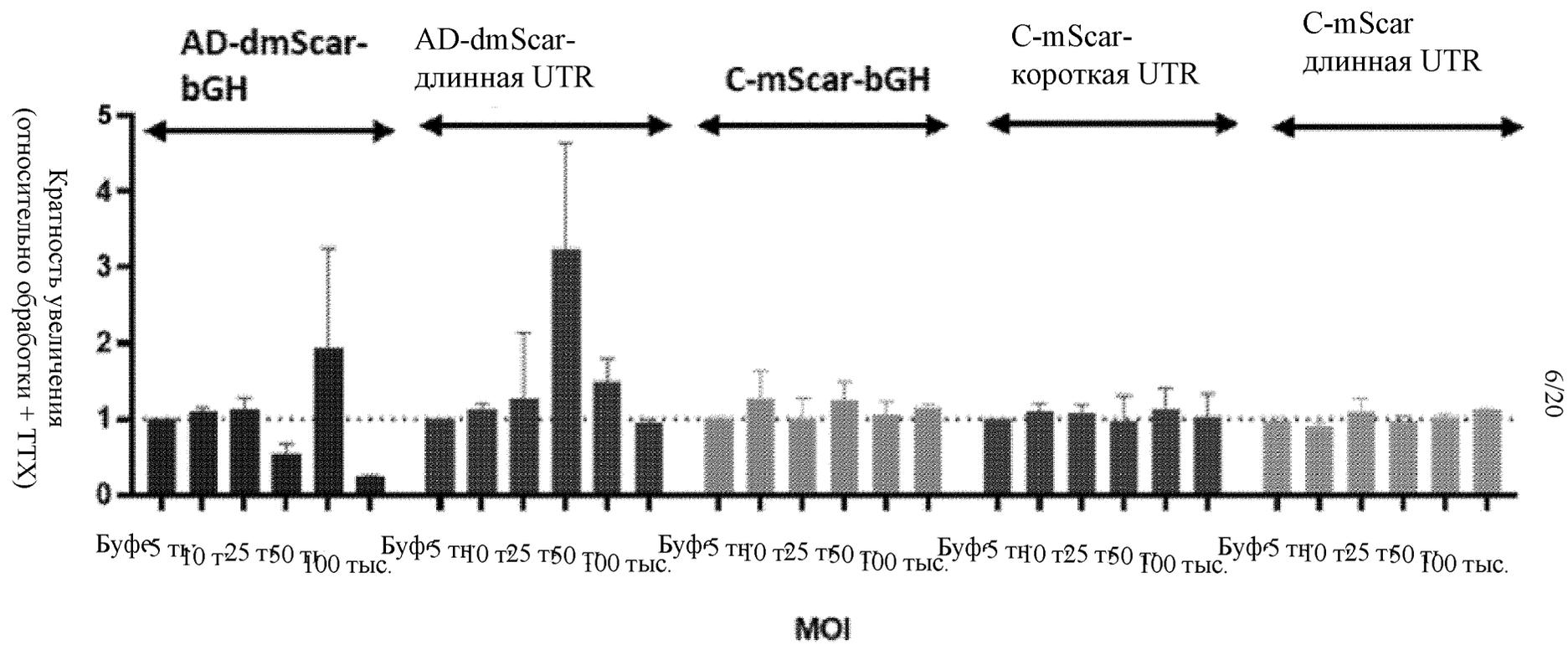
Фиг. 3



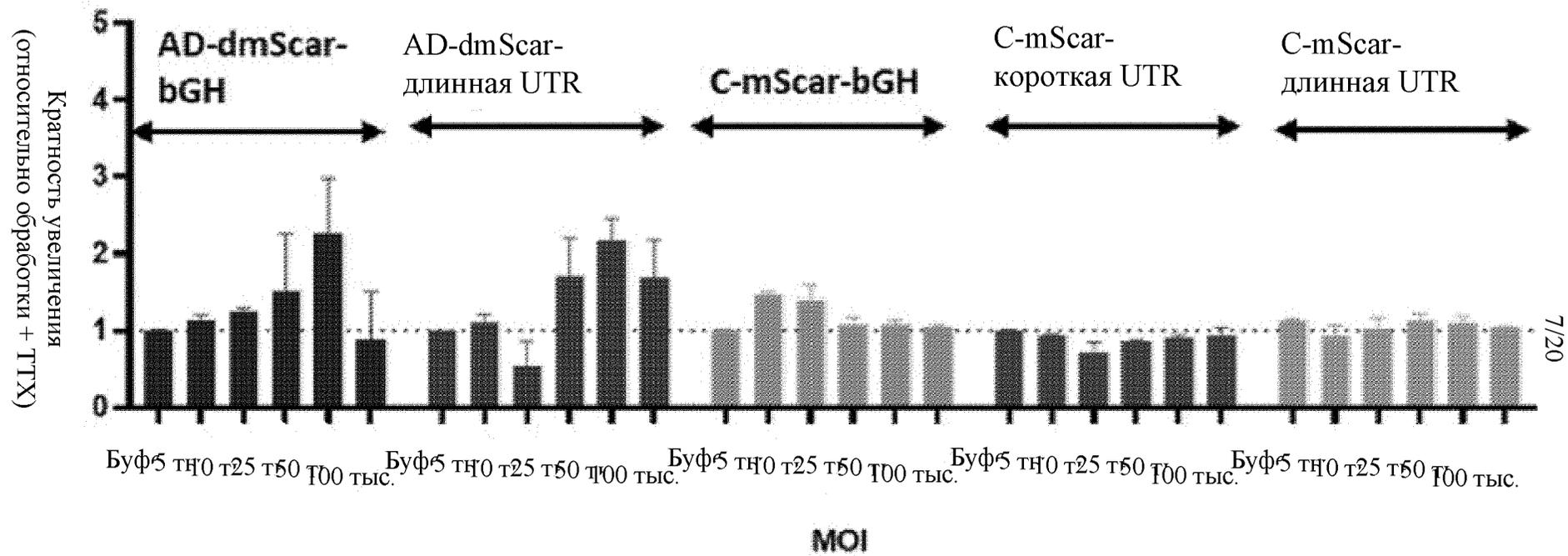
Фиг. 4



Фиг. 5А

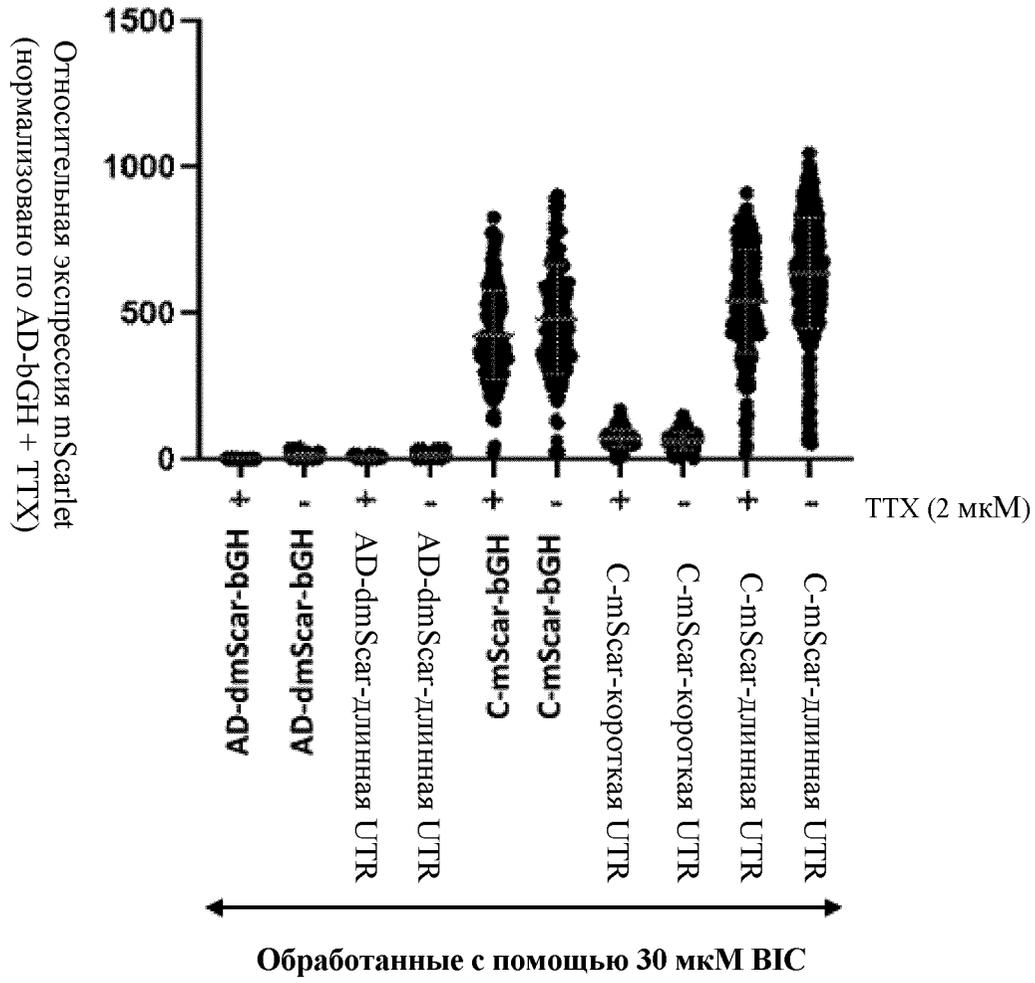


Фиг. 5В

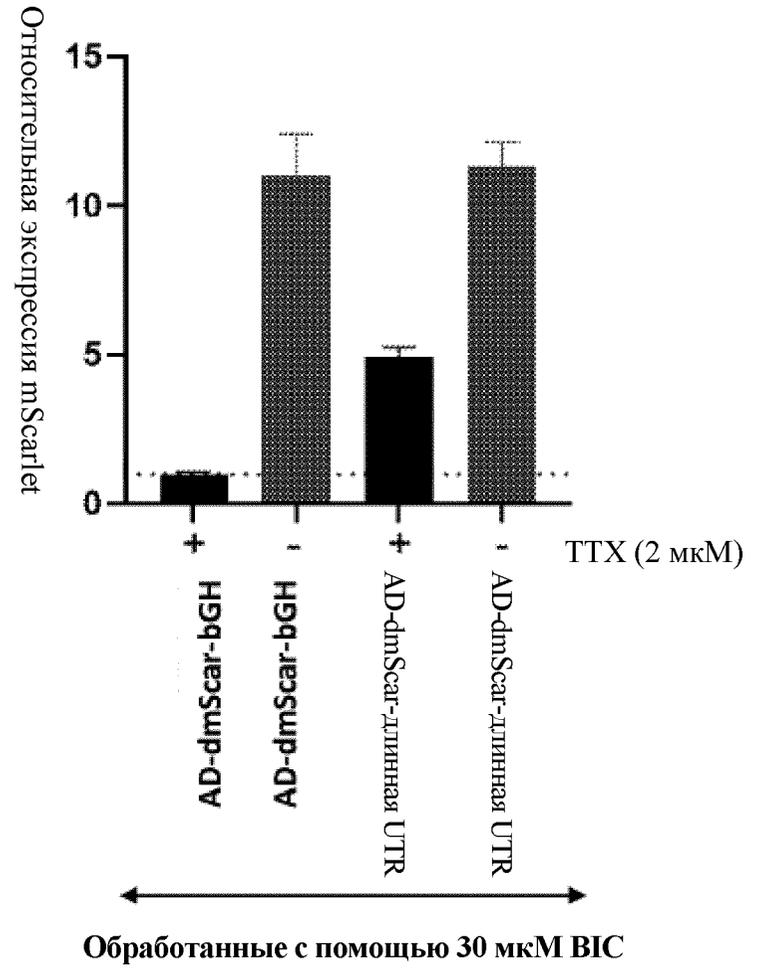


Фиг. 5С

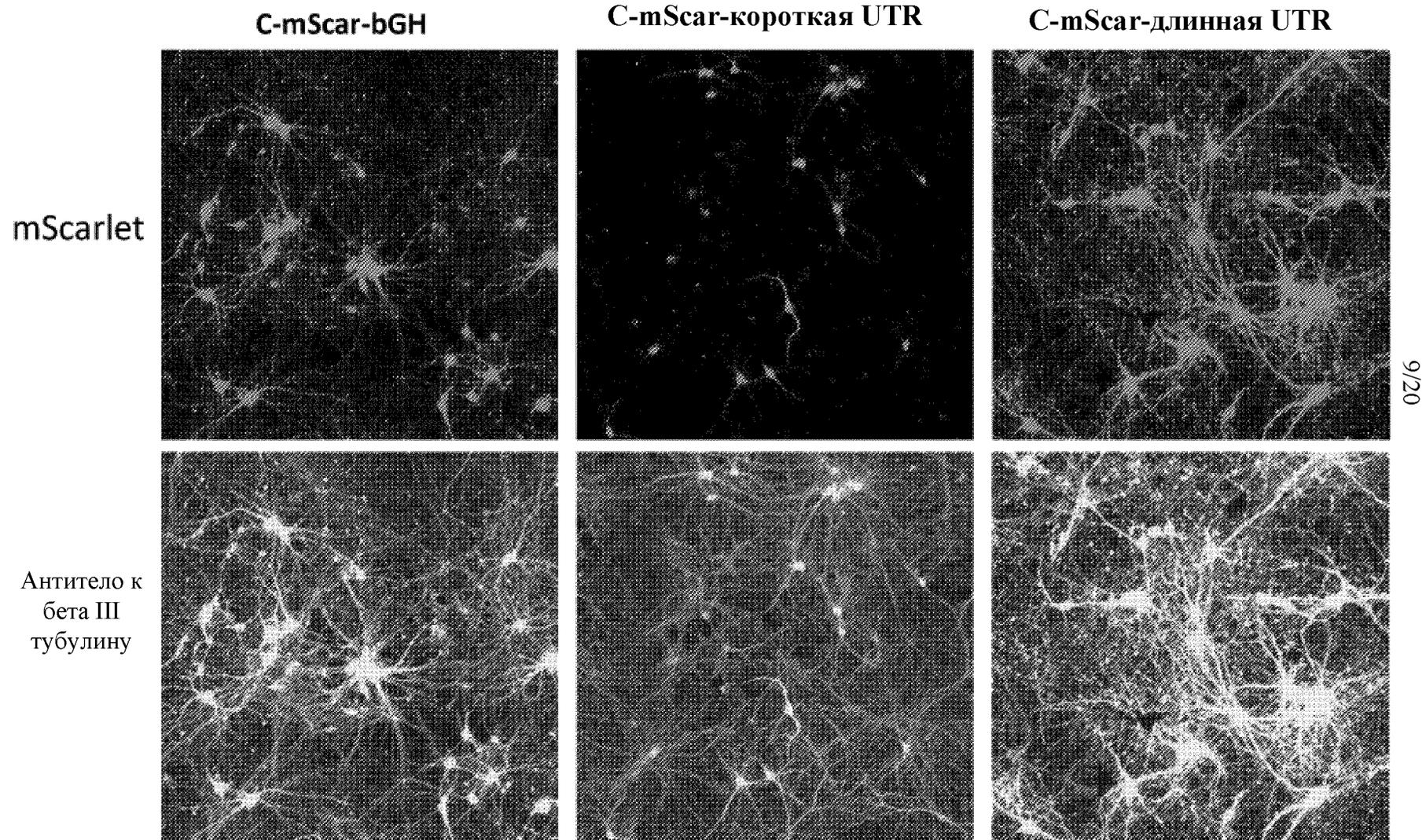
Фиг. 6А



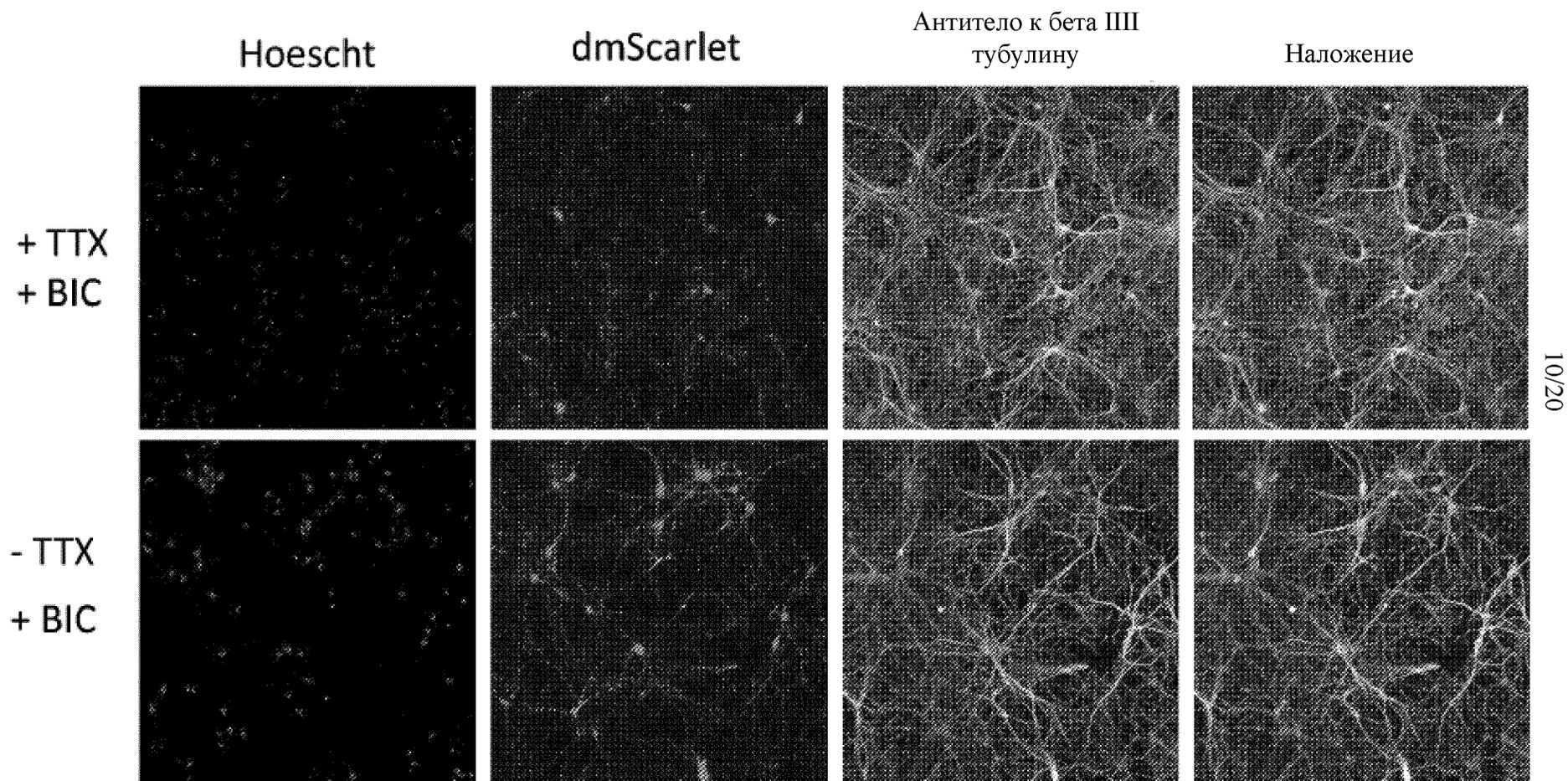
Фиг. 6В



Фиг. 7



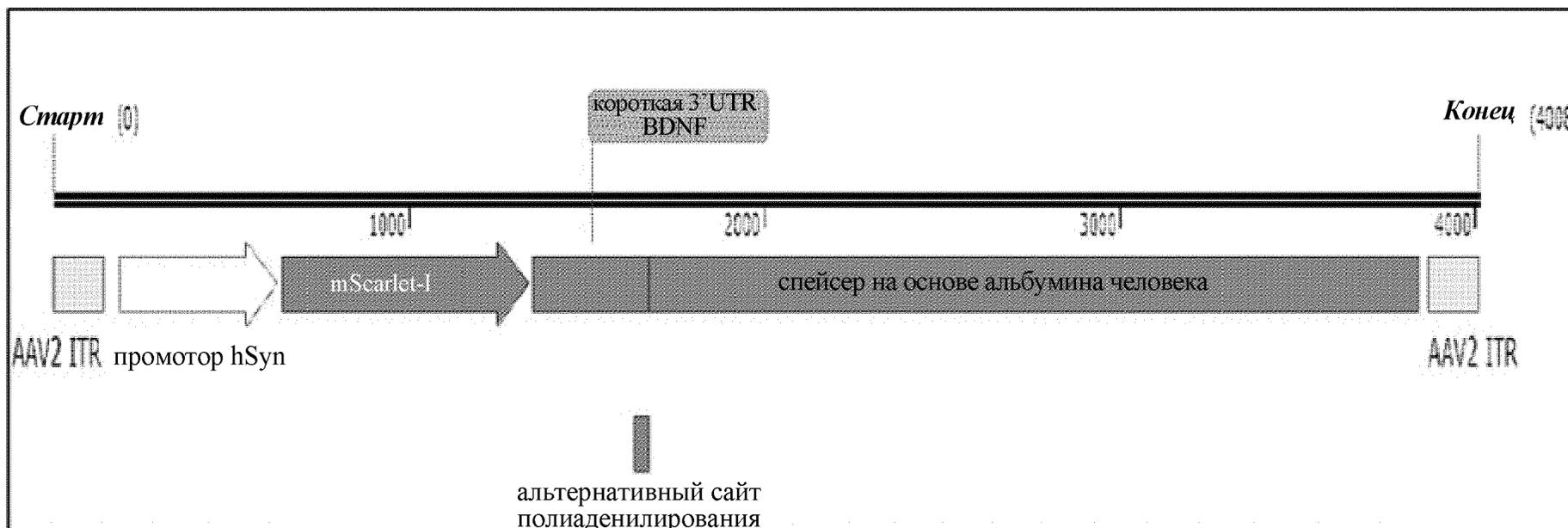
Конструкция – AD-dmScarlet-bGH



10/20

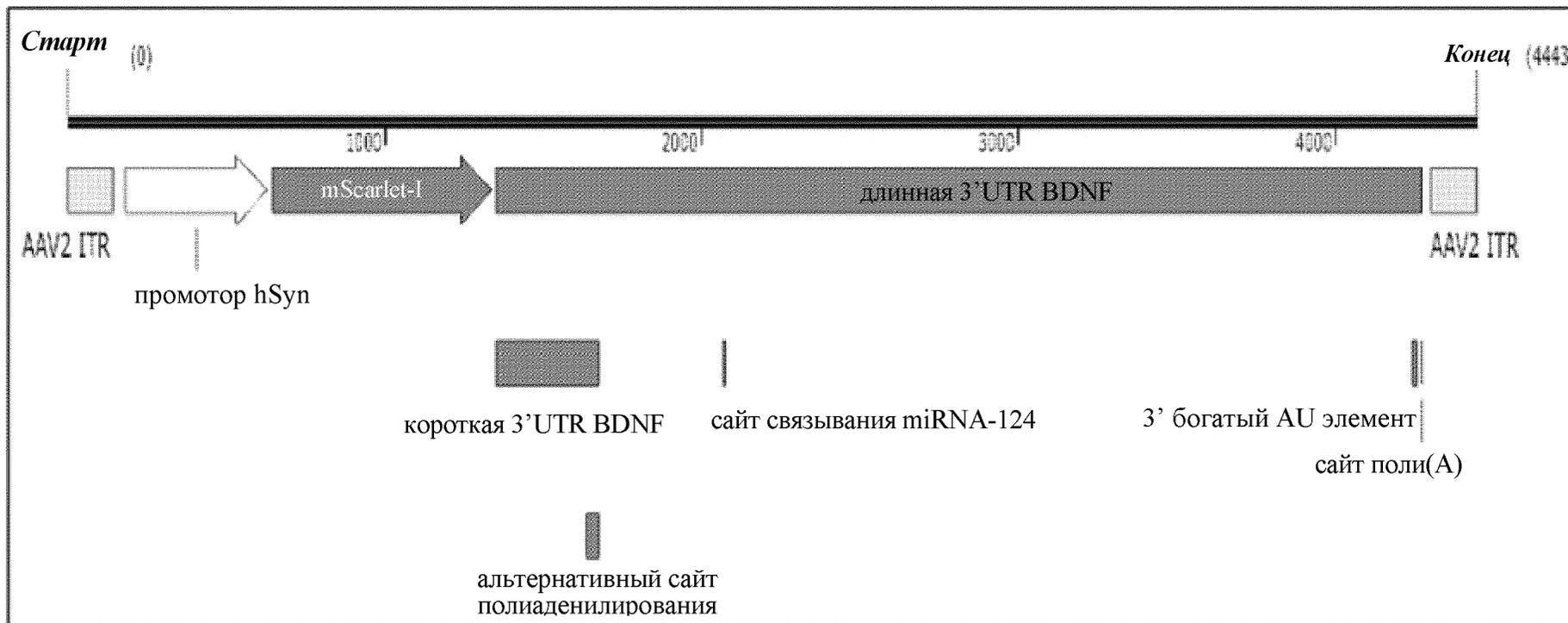
Фиг. 8

C-mScarlet-короткая UTR



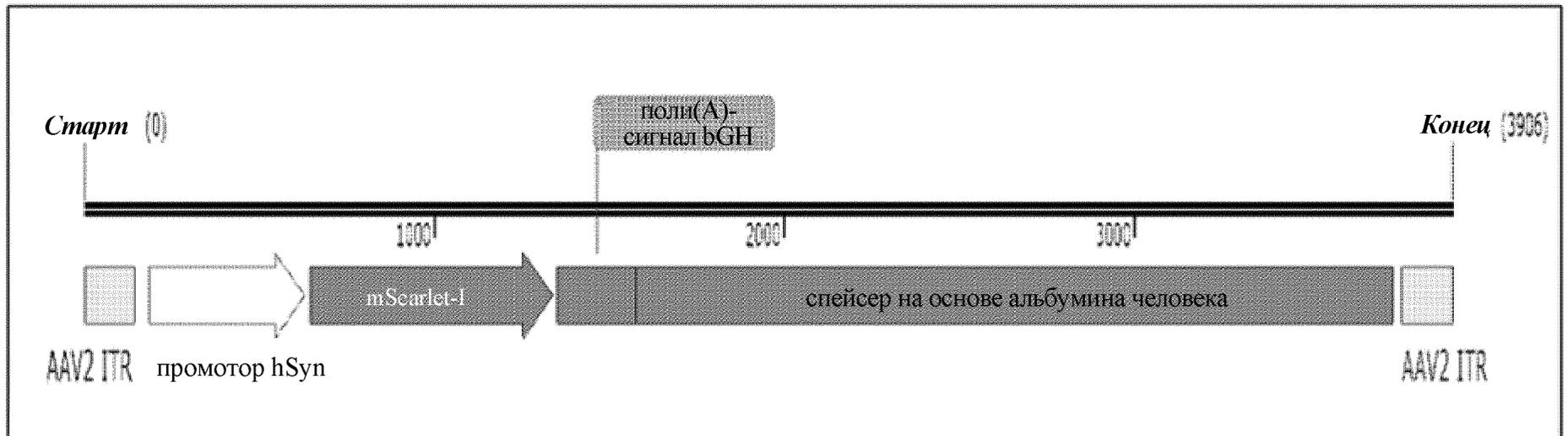
Фиг. 9А

C-mScar-длинная UTR



Фиг. 9В

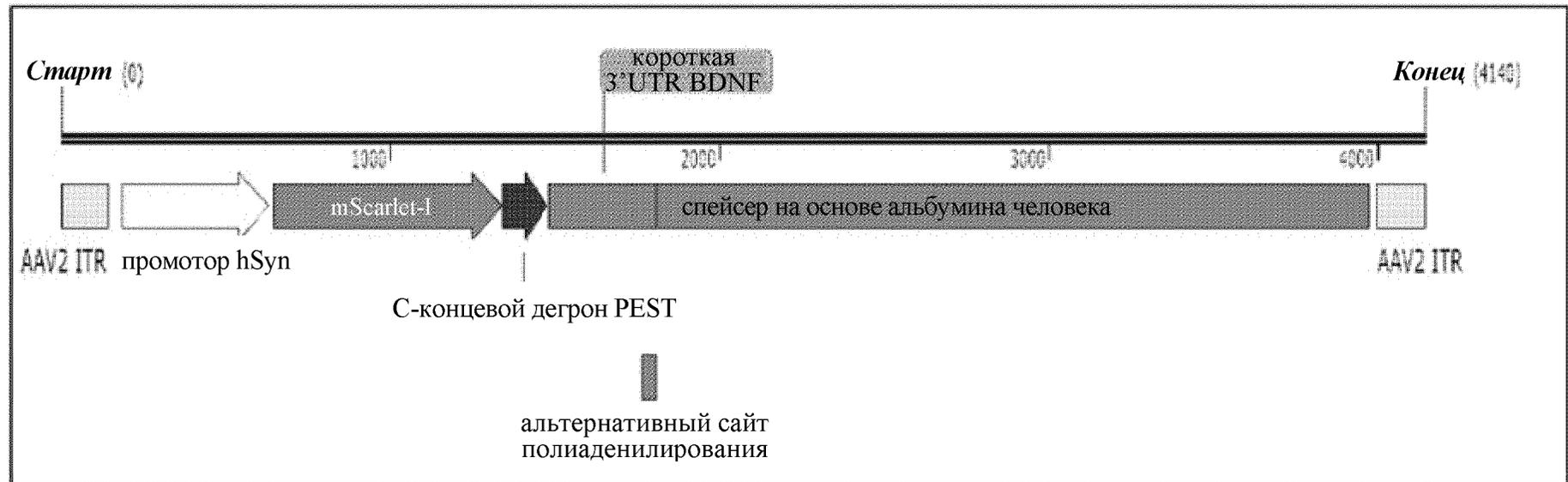
C-mScar-bGH



13/20

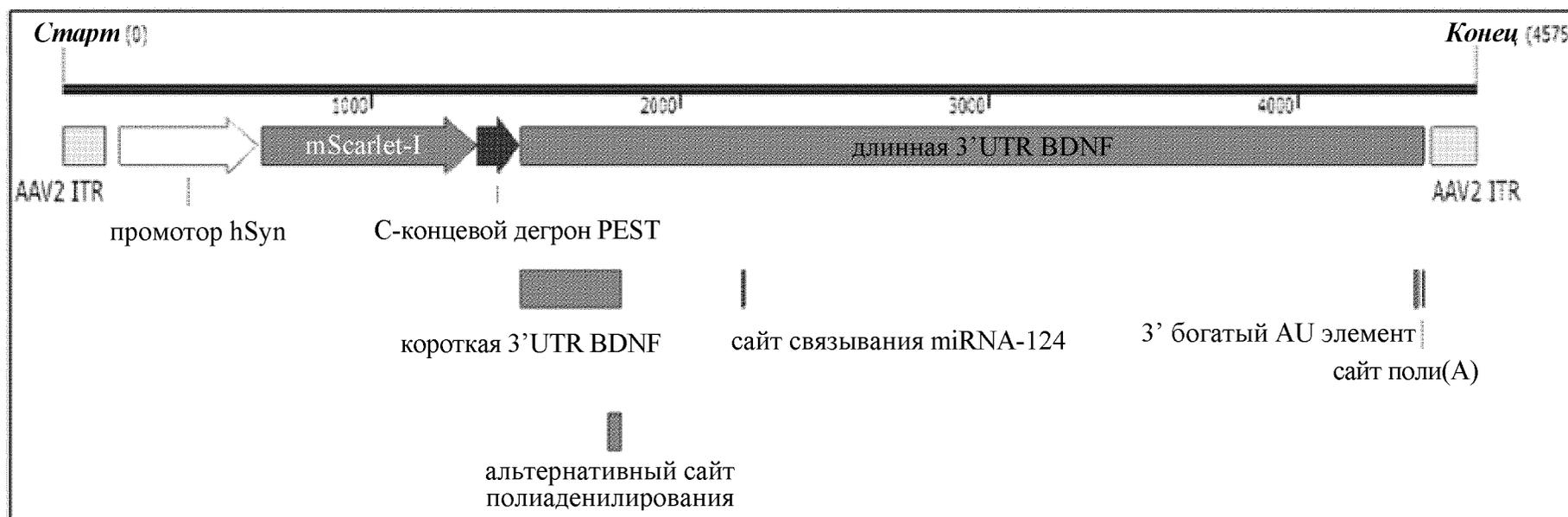
Фиг. 9С

C-dmScar-короткая UTR



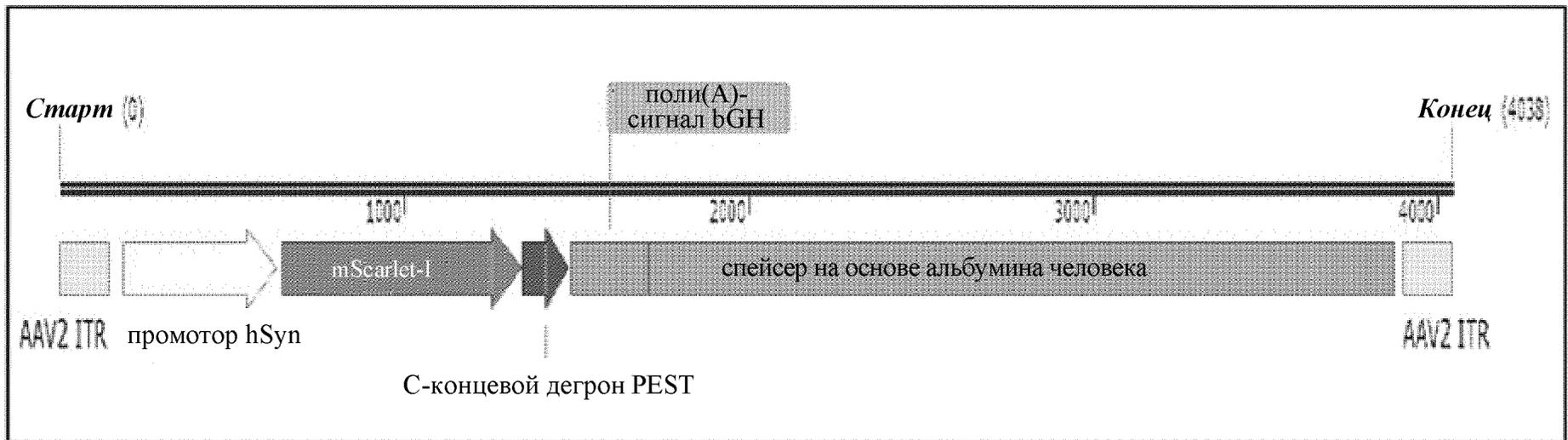
Фиг. 10А

C-dmScarlet-длинная UTR



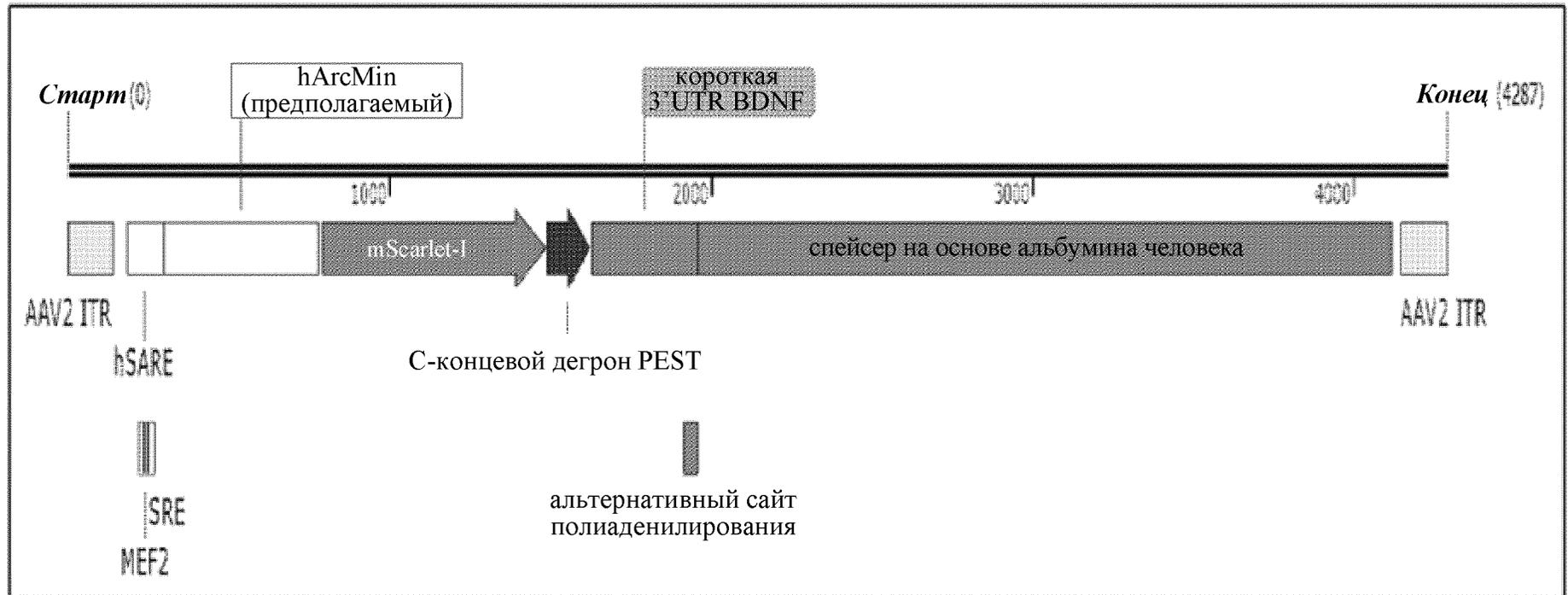
Фиг. 10В

C-dmScarlet-bGH



Фиг. 10С

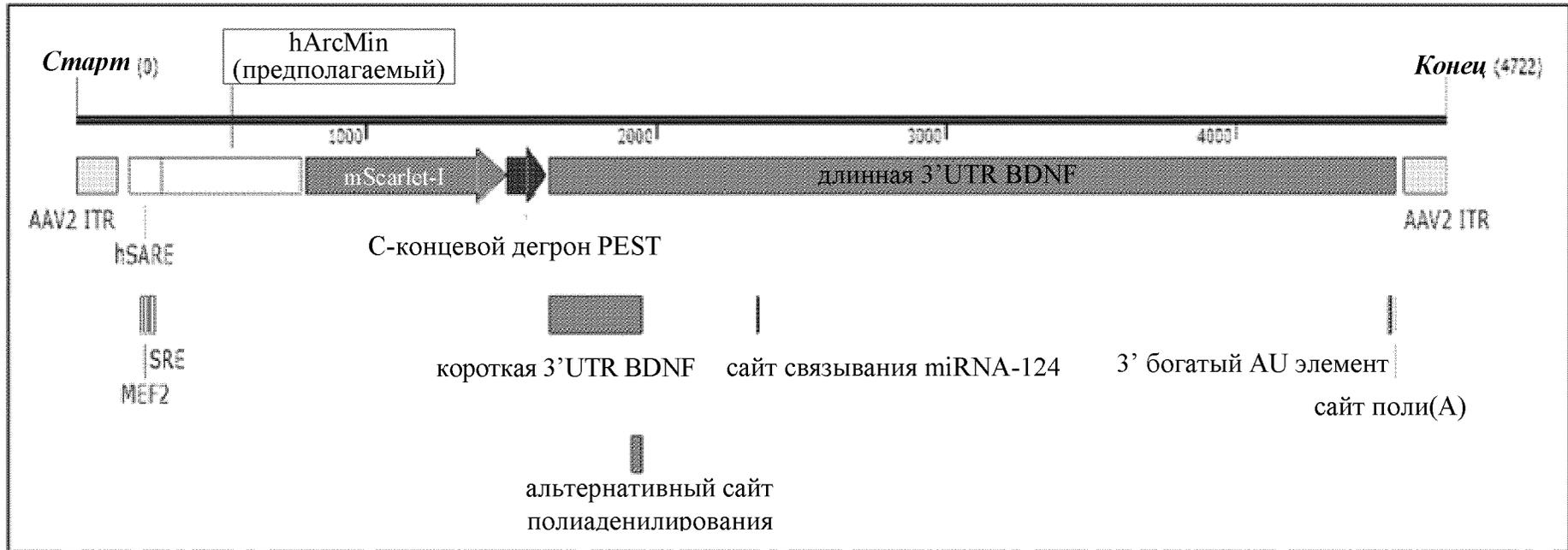
AD-dmScarlet-короткая UTR



17/20

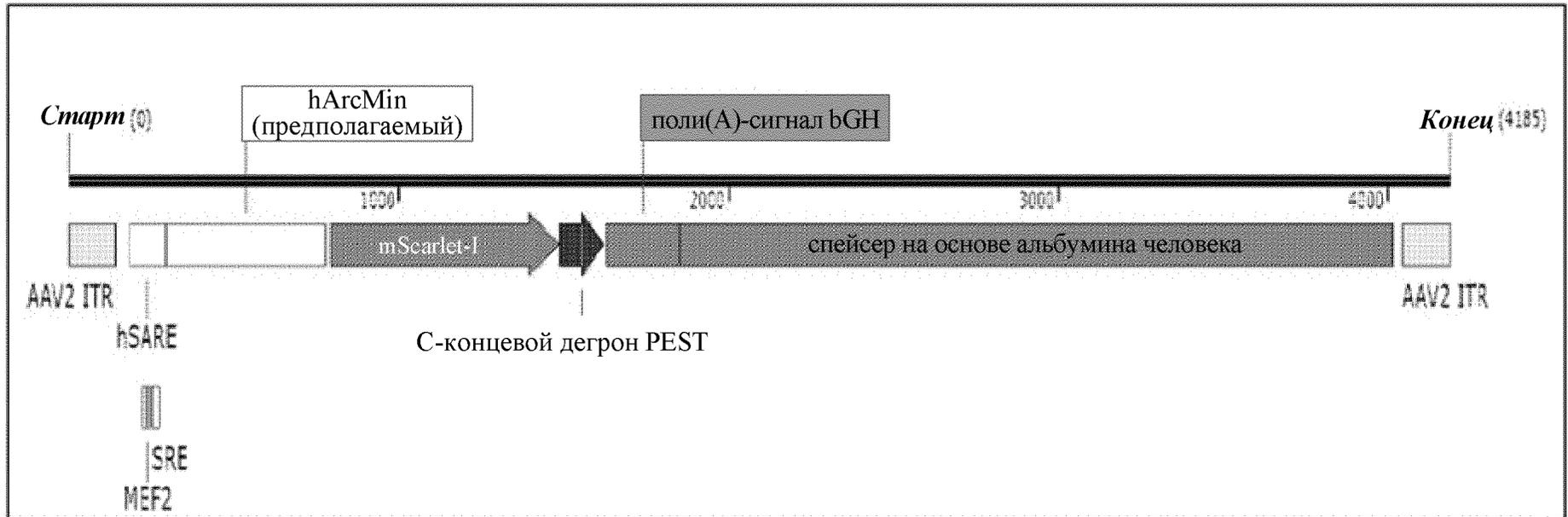
Фиг. 11А

AD-dmScar-длинная UTR



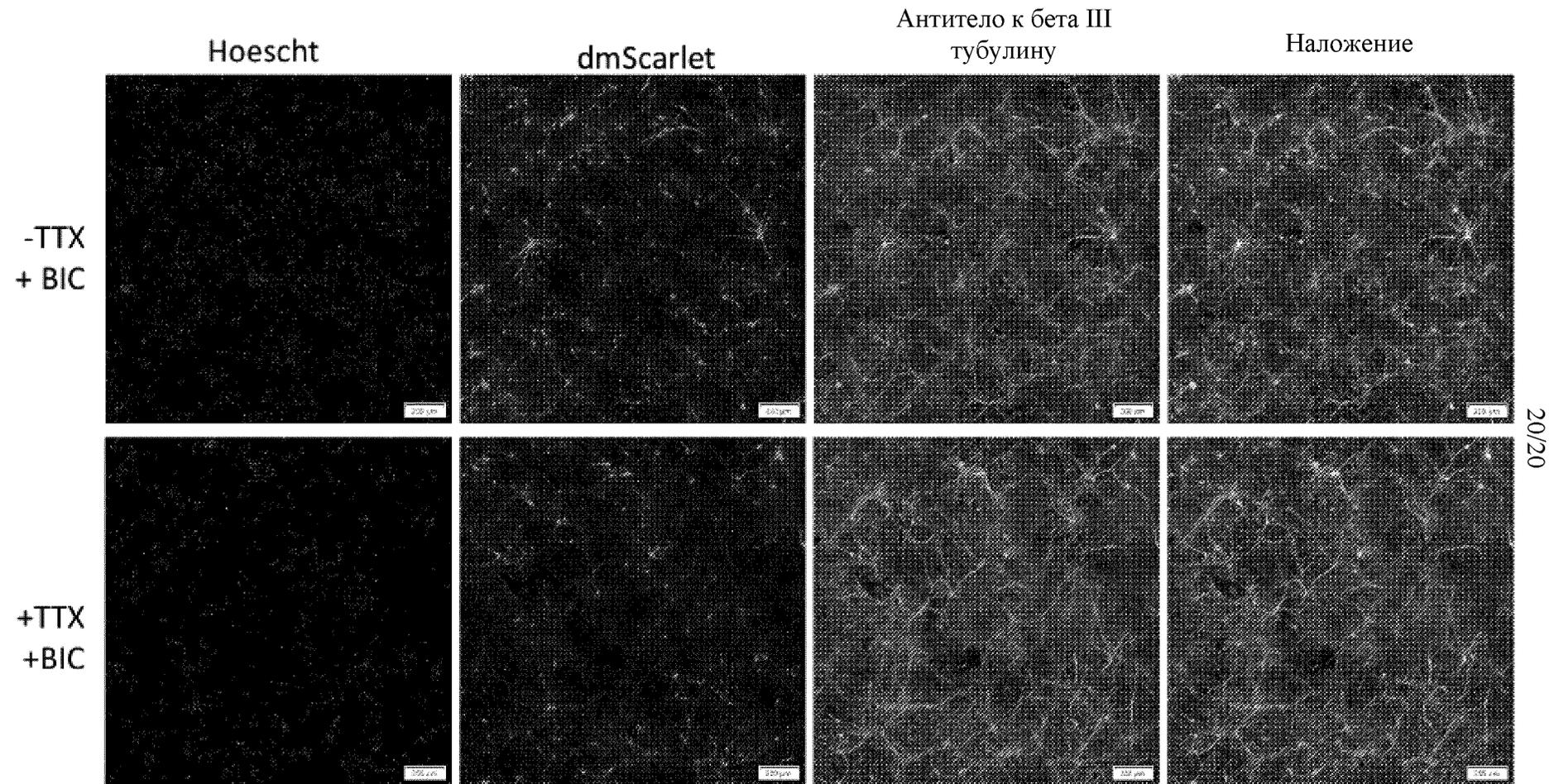
Фиг. 11В

AD-dmScar-bGH



Фиг. 11С

AD-dmScar-длинная UTR



Фиг. 12