

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390531 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.11

(22) Дата подачи заявки
2021.08.11

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

(54) ГЕНОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНСТРУКЦИЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОМОТОРА БЕЛКА 2, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С МЕТИЛ-СрG (MeCP2)

(31) 63/064,431

(32) 2020.08.12

(33) US

(86) PCT/EP2021/072365

(87) WO 2022/034130 2022.02.17

(71) Заявитель:

ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:

Далал Никита, Кабади Ами (US),
Пател Тошал Рохит, Дауни Патрик
Марк, Шривастава Амулиа Нидхи
(BE)

(74) Представитель:

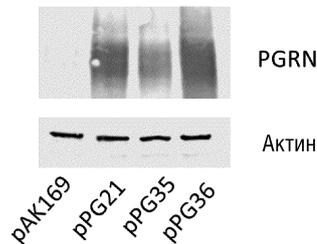
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим промоторные последовательности белка 2, связывающегося с метил-СрG (MeCP2). Настоящее изобретение также относится к векторам, к вирусным векторам, к клеткам-хозяевам и к фармацевтическим композициям, содержащим указанные конструкции нуклеиновых кислот. Настоящее изобретение также относится к терапевтическому применению указанных конструкций нуклеиновых кислот, векторов, вирусных векторов и фармацевтических композиций.

A



B



A1

202390531

202390531

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577034EA/019

ГЕНОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНСТРУКЦИЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОМОТОРА БЕЛКА 2, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С МЕТИЛ-CpG (MeCP2)

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим промоторные последовательности белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2). Настоящее изобретение также относится к векторам, к вирусным векторам, к клеткам-хозяевам и фармацевтическим композициям, содержащим указанные конструкции нуклеиновых кислот. Настоящее изобретение также относится к терапевтическому применению указанных конструкций нуклеиновых кислот, векторов, вирусных векторов и фармацевтических композиций.

Предпосылки создания изобретения

Лобно-височная деменция (ЛВД) является вторым наиболее распространенным типом деменции после болезни Альцгеймера (Olney et al. *Neurol. Clin.* 2017 May; 35(2): 339-374). Мутация в одном аллеле гена GRN, который кодирует белок програнулин (PGRN), связана с развитием ЛВД (Baker et al., *Nature*, 2006 Aug 24;442(7105):916-919). Гомозиготные мутации в GRN связаны с нейронным цероидным липофусцинозом 11 (NCL11), который характеризуется мозжечковой атаксией, судорогами, пигментным ретинитом и когнитивными расстройствами, обычно развивающимися в возрасте от 13 до 25 лет (Faber et al. *Brain*. 2020; 143(1):303-31).

Различные мутации могут вызвать потерю функции PGRN. На мышах-моделях с дефицитом PGRN было показано, что регуляция нейронной экспрессии PGRN с применением методов генотерапии AAV корректирует поведенческие расстройства, связанные с ЛВД (Arrant et al. *Brain*. 2017; 140.5: 1447-1465). Таким образом, существует убедительное биологическое обоснование терапевтического подхода, который позволяет повышать уровни PGRN в тканях и в клетках центральной нервной системы (ЦНС), для лечения нервных заболеваний, связанных с дефицитом PGRN.

Векторы аденоассоциированного вируса (AAV) широко используются в качестве средства для доставки молекулярных терапевтических препаратов для лечения клинических расстройств. Многие методы лечения на основе AAV представляют собой терапевтические средства для генозаместительной терапии. Однако, чтобы обеспечить надежное продуцирование AAV и экспрессию трансгена, конструкция AAV, содержащая представляющий интерес трансген, должна иметь размер от 4,1 до 4,7 т.п.о., чтобы обеспечить оптимальную упаковку AAV. Так называемые «вспомогательные последовательности» или инертная ДНК могут быть добавлены к остову трансгена или вектора для увеличения общей длины конструкции. Однако, векторы являются чувствительными к вспомогательным последовательностям, а поэтому их необходимо тщательно выбирать так, чтобы они не оказывали негативного влияния на экспрессию

трансгена, иммунные ответы у пациента и эффективность упаковки AAV. Другой подход к увеличению длины конструкций AAV заключается в модификации самой последовательности трансгена. Однако, этот подход может оказаться непригодным, если желательно использовать нативную трансгенную нуклеотидную последовательность (дикого типа).

Еще один подход к увеличению общей длины конструкций AAV заключается во включении сконструированной промоторной последовательности. Такие промоторы необходимо тщательно выбирать так, чтобы обеспечить подходящие уровни экспрессии трансгена *in vivo*. Более того, там, где для лечения неврологических расстройств требуется сайт-специфическая экспрессия трансгена, как в случае генотерапии PGRN, решающее значение имеет выбор промотора, который обеспечивает направленную экспрессию представляющего интерес трансгена в ткани или в клетки желаемого типа.

Обычно, нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность, кодирующую PGRN, имеет длину приблизительно 1,8 т.п.о., которая значительно короче оптимальной длины от 4,1 до 4,7 т.п.о. для упаковки конструкции нуклеиновой кислоты в AAV. Таким образом, потребность в промоторных последовательностях, которые могут быть использованы для увеличения длины конструкции вирусного вектора и в то же время для обеспечения надежной и нацеленной на ЦНС экспрессии PGRN, остается актуальной.

Сущность изобретения

Было обнаружено, что промоторы, происходящие от гена белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2), очень эффективны для регуляции экспрессии PGRN, нацеленной на ЦНС, в условиях генотерапии. Было обнаружено, что такие промоторы обеспечивают более высокую экспрессию и эффективность трансдукции PGRN, чем эквивалентные промоторы, содержащие альтернативные промоторы, специфичные для ЦНС, такие как промоторы, происходящие от гена нейрон-специфической энолазы 1 (NSE1).

Авторами настоящего изобретения были также созданы сконструированные промоторы MeCP2 длиной более 2000 п.о. В дополнение к минимальной последовательности промотора MeCP2, эти сконструированные промоторы MeCP2 содержат дополнительный интрон. Нуклеотидные последовательности этих интронов были получены из встречающегося в природе фрагмента гена MECP2 (природного интрона) или были сконструированы путем объединения разрозненных последовательностей, полученных из гена MECP2 (синтетического интрона). Было обнаружено, что конструкции для генотерапии, содержащие сконструированные промоторы MeCP2 согласно изобретению, обеспечивают более высокие уровни экспрессии и/или повышенную эффективность трансдукции клеток ЦНС по сравнению с конструкциями, содержащими минимальный промотор. Кроме того, было обнаружено, что промоторы MeCP2, содержащие синтетический интрон, обеспечивают самые высокие уровни экспрессии и эффективность трансдукции.

Таким образом, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей промотор белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2), где

указанный промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок програнулин (PGRN).

Настоящее изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей сконструированный промотор белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2), где указанный промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок (POI), где сконструированный промотор MeCP2 содержит минимальную промоторную последовательность и по меньшей мере один интрон.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду или вирусный вектор.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению и/или вектор согласно изобретению, и/или которая продуцирует вирусный вектор согласно изобретению, при этом, клетка-хозяин необязательно представляет собой клетку HEK293 или HEK293T.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектор согласно изобретению и/или вирусный вектор согласно изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем.

Настоящее изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, к вектору согласно изобретению, к вирусному вектору согласно изобретению и/или к фармацевтической композиции согласно изобретению для применения в способе лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN), у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к применению конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. А. Схема, иллюстрирующая организацию конструкций pAK169, pPG21, pPG35 и pPG36. MeCP2 (250 п.о.) означает минимальную последовательность промотора MeCP2. GFP означает ген, кодирующий белок, флуоресцирующий в зеленом

диапазоне спектра. 5' MeCP2 (2100 п.о.) означает природный интрон размером приблизительно 2100 п.о. у 5'-конца MeCP2 (250 п.о.). PGRN (1800 п.о.) означает полинуклеотидную последовательность, кодирующую PGRN. Интрон (2100 п.о.) означает синтетическую последовательность интрона длиной приблизительно 100 п.о. **В. Изображение Вестерн-блот-анализа на активность промотора.** Экспрессию PGRN оценивали для каждого из рАК169, рPG21, рPG35 и рPG36.

Фигура 2. А. Схема, иллюстрирующая организацию рАК168, рPG20, рPG33 и рPG34. NSE1 (1300 п.о.) означает минимальную последовательность промотора NSE1. GFP означает ген, кодирующий белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра. 5' NSE1 (1100 п.о.) означает природный интрон длиной приблизительно 1100 п.о. у 5'-конца NSE1 (250 п.о.). PGRN (1800 п.о.) означает полинуклеотидную последовательность, кодирующую PGRN. Интрон (900 п.о.) означает синтетическую последовательность интрона длиной приблизительно 900 п.о. **В. Изображение Вестерн-блот-анализа на активность промотора.** Экспрессию PGRN оценивали для каждого из рАК168, рPG20, рPG33 и рPG34.

Фигура 3. Оценка экспрессии PGRN в первичных нейронах и астроцитах для конструкций рPG20, рPG33, рPG34, рPG21, рPG21, рPG35 и рPG36. А. Гистограммы, иллюстрирующие: (А) эффективность трансдукции в нейронах; (В) уровни экспрессии PGRN в трансдуцированных нейронах; (С) эффективность трансдукции в астроцитах; и (D) уровни экспрессии PGRN в трансдуцированных астроцитах.

Фигура 4. Оценка секреции PGRN первичными нейронами и астроцитами. Гистограмма, иллюстрирующая концентрацию PGRN, секретируемого совместными культурами нейронов и астроцитов, трансдуцированных конструкциями рPG21, рPG35, рPG36, рPG20, рPG26. Также показан нетрансдуцированный контроль.

Фигура 5. Оптимизированные по кодонам конструкции нуклеиновых кислот, кодирующих PGRN. А. Гистограмма, иллюстрирующая уровни экспрессии PGRN для $GRN^{-/-}$ -клеток HAP-1, трансфицированных лентивирусными векторами, кодирующими PGRN, как было определено с помощью ELISA. Векторы, содержащие оптимизированную по кодомам нуклеотидную последовательность, кодирующую PGRN (обозначаемую CpG 0, 4, 9, 17, 25, 40, 71 и 90), сравнивали с вектором, содержащим нуклеотидную последовательность дикого типа, кодирующую PGRN (обозначаемую WT). Также указаны уровни экспрессии PGRN для контрольной трансфекции пустым вектором и клетками дикого типа HAP-1 ($GRN^{+/+}$). **В.** Показан Вестерн-блот-анализ на уровни экспрессии PGRN в $GRN^{-/-}$ -клетках HAP-1, трансфицированных лентивирусным вектором, содержащим оптимизированные по кодомам нуклеотидные последовательности, кодирующие PGRN (обозначенные CpG 25, 40, 71 и 90), и вектором, содержащим нуклеотидную последовательность дикого типа, кодирующую PGRN (обозначенную WT). Уровни экспрессии PGRN также указаны для контрольной трансфекции пустым вектором (обозначенным как контроль), для нетрансфицированных $GRN^{+/+}$ -клеток HAP-1 дикого типа (обозначенных WT) и нетрансфицированных $GRN^{-/-}$ -клеток HAP-1 (обозначенных

КО).

Фигура 6. Экспрессия человеческого PGRN корректирует лизосомный дефицит в первичных GRN^{-/-}-нейронах мышей. А. Показан Вестерн-блот-анализ, осуществляемый для количественного определения уровня лизосомного белка катепсина D в первичных нейронах WT (GRN^{+/+}) и КО (GRN^{-/-}), трансдуцированных лентивирусным вектором, содержащим конструкцию pPG36. В. Гистограмма, иллюстрирующая уровни белков катепсина D (незрелая цепь, зрелая тяжелая цепь и зрелая легкая цепь, соответственно). Значения экспрессии катепсина D нормализованы по уровню экспрессии актина и GADPH.

Фигура 7. ELISA-анализ и FRET-анализ на экспрессию человеческого PGRN (hPGRN) в ЦНС у мышей дикого типа и GRN^{-/-}-мышей после инъекции AAVTT-p1PG36 в полосатое тело.

А. Гистограмма, иллюстрирующая уровни hPGRN в спинномозговой жидкости и в плазме (нг/мл), определенные с помощью ELISA. Высокий уровень hPGRN был обнаружен в спинномозговой жидкости (разведение 1:100) как у мышей WT, так и GRN^{-/-}-мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36 (вектор AAVTT, содержащий конструкцию pPG36). hPGRN также был обнаружен в плазме мышей (разведение 1:10). В. Гистограмма, иллюстрирующая результаты FRET-измерения концентрации hPGRN (нг/мг) в различных областях головного мозга у мышей WT или у GRN^{-/-}-мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36. Самая высокая экспрессия hPGRN была обнаружена вблизи участка инъекции (полосатого тела и среднего мозга). Средние уровни экспрессии hPGRN также были обнаружены в коре и в гиппокампе. Низкие уровни экспрессии hPGRN были обнаружены в отдаленных областях головного мозга, таких как ствол головного мозга, обонятельная луковица и мозжечок. С. Гистограмма, иллюстрирующая уровни hPGRN в спинномозговой жидкости (нг/мл), оцененные с помощью ELISA после введения AAVTT-p1PG36 и AAVTT-p2PG36 мышам дикого типа в полосатое тело. Высокий уровень hPGRN был обнаружен в спинномозговой жидкости (разведение 1:100) у животных, которым вводили обе конструкции AAV.

Фигура 8. Иллюстрация ИГХ-анализа на экспрессию ЦНС человеческого PGRN (hPGRN) в ЦНС GRN^{-/-}-мышей после инъекции AAVTT-p1PG36 в полосатое тело. ИГХ-окрашивание на hPGRN наблюдалось в головном мозге у GRN^{-/-}-мышей с нокаутом, которым вводили AAVTT-p1PG36 в полосатое тело. Иммунореактивный сигнал был специфичным для человеческого програнулина, поскольку у мышей, получавших носитель или контрольный AAV-GFP, сигнала не наблюдалось. Высокие уровни hPGRN были обнаружены в основном во всем переднем мозге, особенно в полосатом теле, в таламусе, в гипоталамусе, в коре головного мозга и в гиппокампе, а также в среднем мозге и в черном веществе GRN^{-/-}-мышей с нокаутом.

Фигура 9. Экспрессия человеческого PGRN влияет на активность катепсина D *in vivo*. Гистограмма, иллюстрирующая оценку ферментативной активности катепсина D в лизате среднего мозга мышей WT (GRN^{+/+}), обработанных носителем (обозначено

заштрихованными кружками), и GRN^{-/-}-мышей с нокаутом, обработанных носителем (заштрихованные кружки) или AAVTT-p1PG36 (заштрихованные треугольники). Повышение ферментативной активности катепсина D наблюдалось у 4-месячных GRN^{-/-}-мышей. Снижение активности катепсина D наблюдалось у GRN^{-/-}-мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36, по сравнению с мышами, которым инъецировали носитель.

Фигура 10. Схема, иллюстрирующая организацию последовательностей нуклеиновых кислот-компонентов в конструкции AAVTT-pPG36 (SEQ ID NO: 17).

Фигура 11. Схема, иллюстрирующая расположение составляющих областей интрона MeCP2_2 (SEQ ID NO: 2) в полноразмерном мышинном гене MeCP2.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность минимального промотора MeCP2.

SEQ ID NO: 2 представляет собой нуклеотидную последовательность интрона MeCP2_2.

SEQ ID NO: 3 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора MeCP2_2.

SEQ ID NO: 4 представляет собой нуклеотидную последовательность экзона 1 интрона MeCP2_2.

SEQ ID NO: 5 представляет собой нуклеотидную последовательность 5'-интрона интрона MeCP2_2.

SEQ ID NO: 6 представляет собой нуклеотидную последовательность 3'-интрона интрона MeCP2_2.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность нуклеотидов экзона 2 интрона MeCP2_2.

SEQ ID NO: 8 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора MeCP2_1.

SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность нуклеотидов интрона MeCP2_1.

SEQ ID NO: 10 и 11 представляют собой нуклеотидные последовательности конструкций pPG35 и pPG36, соответственно.

SEQ ID NO: 12 и 13 соответствуют нуклеотидной и аминокислотной последовательностям PGRN человека, соответственно.

SEQ ID NO: 14 представляет собой нуклеотидную последовательность рестрикционного сайта Age1 (5'-ACCGGT-3').

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP).

SEQ ID NO: 16 представляет собой нуклеотидную последовательность сигнала полиаденилирования SV40 (poly(A)-сигнала).

SEQ ID NO: 17 представляет собой нуклеотидную последовательность

конструкции AAVTT-pPG36.

SEQ ID NO: 18 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды AAVTT-p1PG36.

SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмиды AAVTT-p2PG36.

SEQ ID NO: 20 представляет собой нуклеотидную последовательность 5'-ITR, используемую в конструкции AAVTT-pPG36.

SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность 5'-смежного фрагмента, используемую в конструкции AAVTT-pPG36.

SEQ ID NO: 22 представляет собой нуклеотидную последовательность 3'-смежного фрагмента, используемую в конструкции AAVTT-pPG36.

SEQ ID NO: 23 представляет собой нуклеотидную последовательность 3'-ITR, используемую в конструкции AAVTT-pPG36.

SEQ ID NO: 24 представляет собой нуклеотидную последовательность последовательности Козак, используемую в конструкции AAVTT-pPG36.

Подробное описание изобретения

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые здесь *выше* или *ниже*, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Определения

Используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения артикли «а» и «an» и «the», употребляемые с существительными в формах единственного числа, могут также относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует иное. Так, например, ссылка на «*нуклеиновую кислоту*» включает «*нуклеиновые кислоты*» и т.п.

Термин «*содержит*» (содержащий, включающий) имеет свои общепринятые значения, известные специалистам в данной области, то есть, он включает указанный признак или группу признаков, но этот термин не исключает какой-либо другой указанный признак или группу признаков. Так, например, промотор, содержащий минимальную промоторную последовательность, может содержать другие компоненты, такие как один или несколько интронов. Термин «*состоит из*» также имеет свои общепринятые значения, известные специалистам в данной области, то есть, он исключает другие признаки. Так, например, промотор, состоящий из минимальной последовательности промотора, содержит минимальную последовательность промотора и не содержит никаких других компонентов. Для каждого варианта осуществления изобретения, в котором используется термин «*содержит*» или «*содержащий*», авторы предусматривают использование дополнительного варианта, в котором употребляются термины «*состоит из*» или «*состоящий из*». Таким образом, в каждом варианте раскрытия изобретения, термин «*содержит*» следует рассматривать как «*состоит из*».

Используемые здесь термины «*белок*» и «*полипептид*» являются синонимами и в самом широком смысле относятся к соединению двух или более субъединичных

аминокислот, аналогов аминокислот или других пептидомиметиков. Таким образом, термин «белок» включает короткие пептидные последовательности, а также более длинные полипептиды. Используемый здесь термин «аминокислота» относится либо к природным и/или не-природным, либо к синтетическим аминокислотам, включая D- или L-оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

Используемые здесь термины «пациент» и «индивидуум» являются синонимами. Обычно, пациентом является человек.

Гомология/идентичность последовательностей

Хотя гомология последовательностей также может рассматриваться с точки зрения функционального сходства (то есть, аминокислотных остатков, имеющих сходные химические свойства/функции), однако, в контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы гомология была определена с точки зрения идентичности последовательностей.

Сравнение последовательностей может быть проведено на глаз или, чаще всего, с помощью общедоступных программ сравнения последовательностей. Эти общедоступные и коммерчески доступные компьютерные программы позволяют вычислять процент гомологии (например, процент идентичности) между двумя или более последовательностями.

Процент идентичности может быть вычислен для смежных последовательностей, то есть, одну последовательность выравнивают с другой последовательностью, и каждую аминокислоту в одной последовательности непосредственно сравнивают с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку за один раз. Эта процедура называется «выравниванием без пробелов». Обычно, такое выравнивание без пробелов проводят только по относительно небольшому количеству остатков (например, менее 50 смежных аминокислот). Для сравнения более длинных последовательностей используется оценка с пробелами для достижения оптимального выравнивания, чтобы точно определить уровни идентичности в родственных последовательностях, имеющих инсерцию(и) или делецию(и) по сравнению друг с другом. Подходящей компьютерной программой для проведения такого выравнивания является пакет программ GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, USA; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Примеры другого программного обеспечения, которое может выполнять сравнение последовательностей, включают, но не ограничиваются ими, пакет программ BLAST, FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) и набор инструментов для сравнения GENEWORKS.

Обычно, сравнения последовательностей проводят по длине эталонной последовательности. Так, например, если пользователь хочет определить, является ли данная последовательность на 70% идентичной SEQ ID NO: 2, то эталонной последовательностью будет SEQ ID NO: 2. Так, например, чтобы оценить, является ли последовательность по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 (пример эталонной последовательности), специалист в данной области должен провести

выравнивание по длине SEQ ID NO: 2 и определить, сколько положений в тестируемой последовательности были идентичны положениям SEQ ID NO: 2. Если по меньшей мере 70% положений являются идентичными, то тестируемая последовательность по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID NO: 2. Если последовательность короче, чем SEQ ID NO: 27, то пробелы или отсутствующие положения следует рассматривать как неидентичные положения.

Квалифицированному специалисту известны различные компьютерные программы, которые доступны для определения гомологии или идентичности между двумя последовательностями. Так, например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями могут быть осуществлены с использованием математического алгоритма. В одном варианте осуществления изобретения, процент идентичности между двумя последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот определяют с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (1970), который был включен в программу GAP в программном пакете Accelrys GCG (доступном на сайте <http://www.accelrys.com/products/gcg/>) с использованием либо матрицы Blosum 62, либо матрицы PAM250, и веса пробелов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Используемый здесь термин «фрагмент» относится к непрерывной части эталонной последовательности. Так, например, фрагмент SEQ ID NO: 2 длиной в 50 нуклеотидов относится к 50 смежным нуклеотидам SEQ ID NO: 2.

Используемый здесь термин «функциональный вариант» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или к аминокислотной последовательности, которые были модифицированы по сравнению с эталонной последовательностью, но которые сохраняют функцию указанной эталонной последовательности. Так, например, функциональный вариант промотора MeCP2 сохраняет способность регулировать экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей POI, в клетках ЦНС, таких как нейроны или астроциты. Аналогичным образом, функциональный вариант белка PGRN сохраняет активность эталонного белка PGRN.

Нуклеиновые кислоты

Используемые здесь термины «*полинуклеотид*» и «*молекула нуклеиновой кислоты*» являются синонимами и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, матричную РНК (мРНК), кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК с любой последовательностью, выделенную РНК с любой последовательностью, зонды на основе нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид согласно изобретению может быть представлен в выделенной или по существу выделенной форме. Под термином «по существу выделенный» подразумевается, что полипептид может быть существенно, но не полностью изолирован от любой окружающей среды. Полинуклеотиды могут быть смешаны с носителями или разбавителями, которые не будут негативно влиять на их

предполагаемое применение, а поэтому эти полинуклеотиды будут рассматриваться как по существу выделенные. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая «*кодирует*» выбранный полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo* при их помещении под контроль соответствующих регуляторных последовательностей, например, в экспрессионном векторе. Границы кодирующей последовательности определяются старт-кодоном на 5'-конце (амино) и стоп-кодоном трансляции на 3'-конце (карбокси). В соответствии с настоящим изобретением, такие последовательности нуклеиновых кислот могут включать, но не ограничиваются ими, кДНК из вирусной, прокариотической или эукариотической мРНК, геномные последовательности из вирусной или прокариотической ДНК или РНК и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность терминации транскрипции может быть расположена у 3'-конца от кодирующей последовательности.

Полинуклеотиды могут быть синтезированы в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области, как описано, например, в руководстве Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning - a laboratory manual*; Cold Spring Harbour Press).

Используемый здесь термин «*конструкция нуклеиновой кислоты*» относится к искусственной (например, рекомбинантно полученной или синтезированной) нуклеиновой кислоте, содержащей по меньшей мере одну регуляторную последовательность (такую как промотор) и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес белок (POI). Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению может рассматриваться как экспрессионный кластер. Конструкции нуклеиновых кислот согласно изобретению могут быть выделены или по существу выделены. Обычно, конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержат регуляторную последовательность (такую как промотор MeCP2), функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок (такой как PGRN), что таким образом обеспечивает экспрессию представляющего интерес белка *in vivo*. Конструкции нуклеиновых кислот согласно изобретению могут содержать соответствующие промоторы, энхансеры, инициаторы и другие элементы, такие как, например, сигналы полиаденилирования (polyA) и/или последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка. Конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут также содержать нуклеотидные последовательности, облегчающие их генетическую манипуляцию, такие как рестрикционные сайты (например, рестрикционный сайт AgeI, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14).

Используемый здесь термин «*функционально связанный*» относится к сопоставлению двух или более нуклеотидных последовательностей, которое позволяет каждой из указанных двух или более последовательностей выполнять свою обычную функцию. Обычно, используемый здесь термин «*функционально связанный*» относится к сопоставлению регуляторного элемента (например, промотора, энхансера,

последовательности сигнала полиаденилирования, последовательности WPRE и т.п.) и нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес белок (POI). Так, например, функциональная связь между промотором и нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, позволяет промотору регулировать экспрессию POI *in vivo*.

В дополнение к промотору MeCP2, конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут содержать один или несколько дополнительных регуляторных элементов. Предпочтительными регуляторными элементами являются элементы, функции которых заключаются в стабилизации мРНК, транскрибируемой из конструкции нуклеиновой кислоты, и/или в усилении экспрессии представляющего интерес белка (POI) из конструкции нуклеиновой кислоты, такого как PGRN.

Предпочтительным регуляторным элементом, который может быть использован в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, является посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP). WPRE представляет собой последовательность ДНК, которая, при ее транскрипции в мРНК, создает третичную структуру в транскрипте мРНК, что тем самым повышает стабильность мРНК и экспрессию POI, кодируемого конструкцией нуклеиновой кислоты. В конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, WPRE может находиться у 3'-конца от нуклеотидной последовательности, кодирующей белок POI или PGRN. WPRE может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15 или ее функциональный вариант или фрагмент, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15. Функциональный вариант или фрагмент WPRE сохраняет свойства соответствующего немодифицированного или полноразмерного WPRE. Таким образом, вариант или фрагмент WPRE может создавать третичную структуру в транскрипте мРНК, и/или повышать стабильность транскрипта мРНК, и/или усиливать экспрессию POI, кодируемого конструкцией нуклеиновой кислоты. Повышение уровня экспрессии рассматривается по отношению к мРНК, не содержащей варианта или фрагмента WPRE.

Предпочтительным регуляторным элементом, который может быть использован в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, является последовательность сигнала полиаденилирования (poly(A)). В эукариотических клетках, последовательности сигнала полиаденилирования в транскриптах мРНК распознаются и процессируются с последующим присоединением poly(A)-хвоста, состоящего из множества аденозин-монофосфатов, на 3'-конце транскрипта мРНК. Poly(A)-хвост способствует экспорту мРНК из ядра в цитоплазму и предотвращает расщепление мРНК, что тем самым усиливает экспрессию POI, кодируемого конструкцией нуклеиновой кислоты. В конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, последовательность сигнала полиаденилирования может находиться на 3'-конце от нуклеотидной последовательности, кодирующей белок POI или PGRN. Последовательность сигнала полиаденилирования

может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16 или его функциональный вариант или его фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16. Функциональный вариант или фрагмент последовательности полиаденилирования сохраняет свойства соответствующей немодифицированной или полноразмерной последовательности сигнала полиаденилирования.

Конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут содержать, в направлении от 5' к 3', промотор MeCP2, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок POI или PGRN, WPRE и последовательность сигнала полиаденилирования.

Конструкции нуклеиновых кислот согласно изобретению могут быть представлены в составе векторов (например, плазмид или рекомбинантных вирусных векторов). Подходящим вектором может быть любой вектор, способный нести достаточное количество генетической информации и обеспечивающий экспрессию POI *in vivo*. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может быть введен непосредственно пациенту, нуждающемуся в этом. Такие векторы обычно конструируют методами молекулярной биологии, и эти векторы могут, например, включать плазмидную ДНК и соответствующие инициаторы, промоторы, энхансеры и другие элементы, такие как, например, сигналы полиаденилирования, которые могут быть необходимы, и которые расположены в соответствующей ориентации, для обеспечения экспрессии пептида согласно изобретению. Другие подходящие векторы будут очевидны для специалистов в данной области. В качестве дополнительного примера авторы ссылаются на руководство Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning - a laboratory manual*; Cold Spring Harbour Press).

Промоторы белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2)

Белок 2, связывающийся с метил-CpG (MeCP2), представляет собой репрессор транскрипции и, как было предположено, глобально подавляет транскрипцию генов посредством связывания с метилированными нуклеотидами цитозина в промоторах этих генов с последующим рекрутингом комплексов белков-репрессоров. Кроме того, MeCP2 связывается с ДНК-метилтрансферазой 1, а также регулирует активность гистон-метилтрансферазы, которая служит для поддержания метилирования ДНК и способствует метилированию Lys9 в гистоне H3. Таким образом, посредством связывания с метилированной ДНК, MeCP2 усиливает свою репрессивную функцию посредством множественных эпигенетических модификаций, таких как поддержание метилирования ДНК и деацетилирование и метилирование гистонов.

MeCP2 в высокой степени экспрессируется в головном мозге, в легких и в селезенке и в умеренной степени в сердце и в почках. В частности, в центральной нервной системе (ЦНС), MeCP2 экспрессируется в высоких концентрациях в нейронах.

Ген MECP2 человека (Gene ID: 4204) имеет длину приблизительно 122 т.п.о., расположен на длинном плече X-хромосомы (Xq28) и включает четыре кодирующих

экзона (Singh et al. Nucleic Acids Research. (2008) Vol. 36) № 19 6035-6047). Ген МЕСР2 мыши (ID гена: 17257) имеет длину приблизительно 59 т.п.о. и расположен на X-хромосоме мыши в положении ChrX:73070198-73129296 п.о. (минус-цепь).

Были идентифицированы две изоформы MeCP2: MeCP2_e1 (e1) и MeCP2_e2 (e2). Изоформа e1 имеет длину 498 аминокислот и кодируется экзонами 1, 3 и 4. Изоформа e2 имеет длину 486 аминокислот и кодируется экзонами 2, 3 и 4. Промоторные области генов МЕСР2 мыши и человека были охарактеризованы, *inter alia*, Adachi et al. (Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722). Было обнаружено, что сегмент гена МЕСР2 (-677/+56) обладает сильной промоторной активностью в линиях нейронных клеток и нейронах коры, но не является активным в клетках, не относящихся к нейронам, и в глиальных клетках. Было обнаружено, что область, необходимая для промоторной активности, специфичной для нейронов (называемая MR-элементом), расположена в области 19 п.о. (-63/-45).

Как описано Adachi et al. (Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722), последовательность мышинной (-677/+56) области гена МЕСР2 на 68% сходна с соответствующим промотором MeCP2 человека. В частности, человеческие и мышинные последовательности на 92% идентичны в положениях нуклеотидов от -87 до +56, которые содержат элемент MR.

Последовательности MeCP2, описанные в настоящей заявке (*например*, SEQ ID NO: 1-9) и используемые в приведенных в качестве примеров конструкциях, были получены из гена мышинного МЕСР2. Однако, как отмечалось выше, существует высокий уровень сходства последовательностей между минимальными промоторными областями генов МЕСР2 мыши и человека. Кроме того, существует очень высокая степень идентичности последовательностей между мышинным и человеческим MR-элементом, который отвечает за специфическую нейронную экспрессию. Соответственно, для каждого варианта осуществления изобретения, который включает одну или несколько мышинных нуклеотидных последовательностей MeCP2, также предусмотрен вариант осуществления изобретения, в котором указанные одна или несколько мышинных нуклеотидных последовательностей MeCP2 заменены соответствующей человеческой нуклеотидной последовательностью MeCP2.

Таким образом, используемый здесь термин «*промотор MeCP2*» относится к нуклеотидной последовательности гена МЕСР2 (*например*, мышинного или человеческого гена МЕСР2), которая способна функционировать в качестве промотора, то есть, способна регулировать транскрипцию нуклеотидной последовательности, с которой функционально связан указанный промотор MeCP2, и тем самым регулировать экспрессию белка, кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью. Обычно, последовательность промотора MeCP2, используемая в настоящем изобретении, будет специфичной для ткани или клеток конкретного типа. Предпочтительно, промотор MeCP2, используемый в настоящем изобретении, будет специфичным для клеток ЦНС. Более предпочтительно, промотор MeCP2, используемый в настоящем изобретении, будет специфически

регулировать экспрессию представляющего интерес белка (POI), такого как PGRN, в нейронах и/или астроцитах.

Промотор MeCP2, используемый в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, может представлять собой функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2, описанного в настоящей заявке. Функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2, описанный в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующего немодифицированного или полноразмерного промотора MeCP2. Таким образом, функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2, описанный в настоящей заявке, сохраняет способность регулировать транскрипцию нуклеотидной последовательности, с которой функционально связан указанный функциональный вариант или фрагмент, и тем самым регулировать экспрессию белка, кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью. Функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2, описанный в настоящей заявке, может сохранять специфичность для ткани конкретного типа. Так, например, описанный здесь функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2 может быть специфичным для клеток ЦНС. Функциональный вариант или фрагмент промотора MeCP2, описанный в настоящей заявке, может специфически регулировать экспрессию представляющего интерес белка (POI), такого как PGRN, в нейронах и/или астроцитах.

Промотор MeCP2, используемый в настоящем изобретении, может содержать *«минимальную промоторную последовательность»*, под которой следует понимать нуклеотидную последовательность промоторной области гена MECP2 достаточной длины, которая содержит необходимые элементы для функционирования в качестве промотора MeCP2, то есть, способна регулировать транскрипцию нуклеотидной последовательности, с которой функционально связан указанный промотор MeCP2, и тем самым регулировать экспрессию белка, кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью.

Минимальный промотор MeCP2, используемый в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, может быть функциональным вариантом или фрагментом описанного здесь минимального промотора MeCP2. Функциональный вариант или фрагмент минимального промотора MeCP2, описанный в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующего немодифицированного или полноразмерного минимального промотора MeCP2. Таким образом, описанный здесь функциональный вариант или фрагмент минимального промотора MeCP2 имеет достаточную длину и содержит элементы, необходимые для функционирования в качестве промотора MeCP2, и способен регулировать транскрипцию нуклеотидной последовательности, с которой функционально связан указанный функциональный вариант или фрагмент, и тем самым регулировать экспрессию белка, кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью.

Предпочтительная минимальная промоторная последовательность, которая может быть использована в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, может включать

нуклеотидную последовательность или состоять из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1. Фрагменты любой длины SEQ ID NO: 1 или указанный функциональный вариант могут быть также использованы в качестве минимальной промоторной последовательности в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению. Минимальная промоторная последовательность может составлять 160-300 п.о., 170-290 п.о., 180-280 п.о., 190-270 п.о., 200-260 п.о., 210-250 п.о., 220-240 п.о. или приблизительно 230 п.о.

Промотор MeCP2, используемый в настоящем изобретении, может содержать один или несколько интронов. Используемый здесь термин «*интрон*» относится к внутригенной некодирующей нуклеотидной последовательности. Обычно, интроны транскрибируются из ДНК в матричную РНК (мРНК) во время транскрипции гена, но вырезаются из транскрипта мРНК посредством сплайсинга до ее трансляции.

Промотор MeCP2, используемый в настоящем изобретении, может содержать функциональный вариант или фрагмент описанного здесь интрона. Функциональный вариант или фрагмент интрона, описанный в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующего немодифицированного или полноразмерного интрона. Таким образом, функциональные варианты или фрагменты интрона, описанные в настоящей заявке, не являются кодирующими. Функциональные варианты или фрагменты интрона, описанные в настоящей заявке, могут также сохранять способность к транскрипции с ДНК в мРНК и/или способность к вырезанию из мРНК посредством сплайсинга.

Промотор MeCP2, который содержит минимальную промоторную последовательность и интрон, упоминается здесь как «*сконструированный промотор MeCP2*».

Интроны, которые могут быть включены в промоторы MeCP2, используемые в настоящем изобретении, могут происходить от природной некодирующей области гена MECР2. Таким образом, термин «интрон» охватывает нуклеотидную последовательность, соответствующую встречающейся в природе непрерывной нуклеотидной последовательности гена MECР2. Такие интроны называются здесь «*природными интронами*».

Предпочтительный интрон, который может быть использован в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 9. Также могут быть использованы фрагменты указанного интрона. Такие фрагменты могут иметь длину 1000-2107 п.о., 1200-2100 п.о., 1400-2000 п.о., 1600-1900 п.о. или 1700-1800 п.о. Могут быть также использованы и более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие

указанный интрон.

Предпочтительный промотор MeCP2, который может быть использован в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, обозначен как MeCP2_1 (SEQ ID NO: 8). Этот промотор MeCP2 содержит интрон, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9. Таким образом, промотор MeCP2, используемый в конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность или состоять из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 8. Могут быть также использованы фрагменты указанного промотора MeCP2. Такие фрагменты могут иметь длину 1000-2336 п.о., 1200-2300 п.о., 1400-2200 п.о., 1600-2100 п.о., 1700-2000 п.о. или 1800-1900 п.о. Могут быть также использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанный промотор MeCP2.

Промоторы MeCP2, используемые в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, могут содержать *«синтетический интрон»*. Под синтетическим интроном подразумевается такой интрон, который был сконструирован из двух или более несопоставимых (например, отдельных и несмежных) последовательностей, например, гена MECР2. Две или более последовательностей, используемых для получения синтетического интрона, могут происходить от любого положения гена MECР2. Таким образом, синтетический интрон может содержать нуклеотидную последовательность интрона гена MECР2, которая, таким образом, называется *«интронной последовательностью»*.

Альтернативно, нуклеотидные последовательности компонентов синтетического интрона необязательно должны происходить от интрона гена MECР2, а вместо этого они могут происходить от экзона (то есть, нуклеотидов, кодирующих белок) гена MECР2. Обычно, нуклеотидная последовательность экзона гена MECР2 может быть модифицирована (например, путем усечения, делеции, замены и т.п.) и/или размещена внутри синтетического интрона таким образом, что экзонная последовательность не экспрессируется. Таким образом, такие нуклеотидные последовательности не способны продуцировать транскрипт, который может быть транслирован в полипептид (например, белок MeCP2 или его фрагмент). Соответственно, синтетические интроны, используемые в описанных здесь промотерах MeCP2, могут содержать одну или несколько *«неэкспрессирующих экзонных последовательностей»*, например, гена MECР2. Соответственно, указанные неэкспрессирующиеся экзонные последовательности могут фланкировать интронную последовательность, что будет обеспечивать сайты сплайсинга. Эти сайты сплайсинга позволяют вырезать синтетический интрон посредством сплайсинга из мРНК, продуцируемой посредством транскрипции конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей указанный синтетический интрон.

Синтетический интрон, используемый в промотерах MeCP2, описанных в настоящей заявке, может содержать функциональный вариант или фрагмент

неэкспрессирующей экзонной последовательности, описанной в настоящей заявке. Функциональный вариант или фрагмент неэкспрессирующей экзонной последовательности, описанной в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующей немодифицированной или полноразмерной экзонной последовательности. Таким образом, функциональные варианты или фрагменты описанных здесь неэкспрессирующих экзонных последовательностей могут сохранять способность фланкировать интронную последовательность и могут содержать сайты сплайсинга. Они могут обладать способностью связываться (или сплайсироваться) вместе после удаления экзона.

Синтетический интрон, используемый в описанных здесь промотерах MeCP2, может содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять интронных последовательностей и/или одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять неэкспрессирующих экзонных последовательностей. Предпочтительно, синтетический интрон содержит две интронные последовательности и две неэкспрессирующие экзонные последовательности.

Предпочтительная неэкспрессирующая экзонная последовательность, которая может быть использована в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4. Также могут быть использованы фрагменты указанных неэкспрессирующих экзонных последовательностей. Также могут быть использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанную неэкспрессирующую экзонную последовательность.

Предпочтительная неэкспрессирующая экзонная последовательность, которая может быть использована в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, включает нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7. Также могут быть использованы фрагменты указанных неэкспрессирующих экзонных последовательностей. Также могут быть использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанную неэкспрессирующую экзонную последовательность.

Предпочтительная интронная последовательность, которая может быть использована в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, включает нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5. Также могут быть использованы фрагменты указанных интронных последовательностей. Также могут быть использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие

указанные интронные последовательности.

Предпочтительная интронная последовательность, которая может быть использована в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, включает нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6. Также могут быть использованы фрагменты указанных интронных последовательностей. Также могут быть использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанные интронные последовательности

Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению может содержать промотор MeCP2 или состоять из промотора MeCP2, содержащего по меньшей мере один синтетический интрон, который включает:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5;

(c) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6; и/или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Синтетический интрон может включать (a), (b), (c) и/или (d), указанные выше в любом порядке в направлении от 5' к 3'. Синтетический интрон может включать (a), (b), (c) и/или (d) в том порядке, в котором они перечислены выше. Так, например, в направлении от 5' к 3', синтетический интрон может содержать:

- i. (a) и (b);
- ii. (a) и (c);
- iii. (a) и (d);
- iv. (b) и (c);
- v. (b) и (d);
- vi. (c) и (d);
- vii. (a), (b) и (c);
- viii. (a), (b) и (d);

ix. (b), (c) и (d); или

x. (a), (b), (c) и (d).

Синтетический интрон может содержать неэкспрессирующую экзонную последовательность на своем 5'-конце. Так, например, синтетический интрон может содержать на своем 5'-конце:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4; или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Синтетический интрон может содержать неэкспрессирующую экзонную последовательность на своем 3'-конце:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4; или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Синтетический интрон может содержать неэкспрессирующие экзонные последовательности на своем 5'-конце и на своем 3'-конце. Так, например, синтетический интрон может содержать на своем 5'-конце:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4; или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7; и

синтетический интрон может содержать на своем 3'-конце:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4; или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Неэкспрессирующие экзонные последовательности на 5'-конце и 3'-конце может фланкировать одну или несколько интронных последовательностей, таких как одна или несколько интронных последовательностей, описанных в настоящей заявке. Так, например, в направлении от 5' к 3', синтетический интрон, используемый в промотерах MeCP2, описанных в настоящей заявке, может содержать:

- i. (a), (b) и (d);
- ii. (a), (c) и (d);
- iii. (a), (b), (c) и (d);
- iv. (a), (c), (b) и (d);
- v. (a), (b) и (a);
- vi. (a), (c) и (a);
- vii. (a), (b), (c) и (a);
- viii. (a), (c), (b) и (a)
- ix. (d), (b) и (d);
- x. (d), (c) и (d);
- xi. (d), (b), (c) и (d);
- xii. (d), (c), (b) и (d);
- xiii. (d), (b) и (a);
- xiv. (d), (c) и (a);
- xv. (d), (b), (c) и (a); или
- xvi. (d), (c), (d) и (a), где:

(a) соответствует неэкспрессирующей экзонной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4;

(b) соответствует интронной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5;

(c) соответствует интронной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6; и

(d) соответствует неэкспрессирующей экзонной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Предпочтительный синтетический интрон, который может быть использован в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, содержит, в направлении от 5' к 3', или состоит из них:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5;

(c) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6; и/или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Предпочтительный синтетический интрон, который может быть использован в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, содержит, в направлении от 5' к 3', или состоит из них:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5;

(c) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6; и

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Предпочтительный синтетический интрон, который может быть использован в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, состоит, в направлении от 5' к 3', из:

(a) неэкспрессирующей экзонной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 4;

(b) интронной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 5;

(c) интронной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 6; и

(d) неэкспрессирующей экзонной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант, или фрагмент, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 7.

Предпочтительный синтетический интрон, который может быть использован в промоторах MeCP2, описанных в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 2. Также могут быть использованы фрагменты указанного синтетического интрона. Такие фрагменты могут иметь длину 1000-2005 п.о., 1200-2000 п.о., 1400-1900 п.о., 1600-1800 п.о. или 1700-1800 п.о. Могут быть также использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанный синтетический интрон.

Предпочтительный промотор MeCP2, который может быть использован в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, обозначен как MeCP2_2 (SEQ ID NO: 3). Эта промоторная область содержит синтетический интрон, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2. Таким образом, промотор MeCP2, используемый в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность или состоять из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 3. Могут быть также использованы фрагменты указанных промоторов MeCP2. Такие фрагменты могут иметь длину 1000-2234 п.о., 1200-2200 п.о., 1400-2100 п.о., 1600-2000 п.о. или 1700-1900 п.о. Могут быть также использованы более длинные нуклеотидные последовательности, содержащие указанный промотор MeCP2.

Конструкции нуклеиновых кислот, содержащие промоторы MeCP2, описанные в настоящей заявке, обеспечивают повышенную экспрессию представляющего интерес белка (POI), который они кодируют, например, PGRN. Указанные конструкции также

обеспечивают повышенную эффективность трансдукции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия POI или белка PGRN из конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, содержащей промотор MeCP2, может быть повышена по сравнению с конструкцией, не содержащей промотора MeCP2, но в остальном идентичной. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению, содержащая промотор MeCP2, обеспечивает повышенную эффективность трансдукции по сравнению с конструкцией, которая не содержит промотора MeCP2, но в остальном является идентичной.

Конструкции нуклеиновых кислот, содержащие сконструированные промоторы MeCP2, описанные в настоящей заявке, обеспечивают повышенную экспрессию представляющего интерес белка (POI), который они кодируют, например, PGRN. Указанные конструкции также обеспечивают повышенную эффективность трансдукции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия POI или белка PGRN из конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, содержащей сконструированный промотор MeCP2, может быть увеличена по сравнению с конструкцией без сконструированного промотора MeCP2, такой как эквивалентная конструкция, содержащая минимальный промотор MeCP2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению, содержащая сконструированный промотор MeCP2, обеспечивает повышенную эффективность трансдукции по сравнению с конструкцией без сконструированного промотора MeCP2, такой как эквивалентная конструкция, содержащая минимальный промотор MeCP2.

Конструкции нуклеиновых кислот, которые содержат сконструированные промоторы MeCP2, содержащие описанный здесь синтетический интрон, обеспечивают повышенную экспрессию представляющего интерес белка (POI), который они кодируют. Указанные конструкции также обеспечивают повышенную эффективность трансдукции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия POI или белка PGRN из конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, которая содержит сконструированный промотор MeCP2, содержащий синтетический интрон, может быть повышена по сравнению с конструкцией, в которой отсутствует сконструированный промотор MeCP2, включающий синтетический интрон, например, конструкцией, содержащей минимальный промотор MeCP2, или конструкцией, содержащей сконструированный промотор MeCP2, в котором отсутствует синтетический интрон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению, которая содержит сконструированный промотор MeCP2, включающий синтетический интрон, обеспечивает повышенную эффективность трансдукции по сравнению с конструкцией, в которой отсутствует сконструированный промотор MeCP2, содержащий синтетический интрон, например, с конструкцией, содержащей минимальный промотор MeCP2, или с конструкцией, которая содержит сконструированный промотор MeCP2 без синтетического интрона.

Програнулин (PGRN)

Програнулин (PGRN; также известный как предшественник гранулина-эпителина, проэпителин, фактор роста клеток рака предстательной железы (PC) и акрогранин) представляет собой секретируемый гликопротеин, который экспрессируется клетками многих типов по всему организму. Кодированный одним геном (GRN; Gene ID: 2896) на хромосоме 17q21, PGRN представляет собой богатый цистеином белок из 593 аминокислот с вычисленной молекулярной массой 68,5 кДа. Он содержит 7,5 гранулин-подобных доменов, каждый из которых состоит из высококонсервативных tandemных повторов из 12 цистеинильных мотивов. Протеолитическое расщепление PGRN внеклеточными протеазами, такими как эластаза, дает более мелкие пептидные фрагменты, называемые гранулинами или эпителинами (например, гранулином А, гранулином В, гранулином С и т.п.). Эти фрагменты имеют размер от 6 до 25 кДа и участвуют в ряде биологических функций.

Дефицит PGRN тесно связан с патогенезом лобно-височной деменции (ЛВД), также называемой деменцией лобно-височной доли. Мутация в одном аллеле гена GRN, который кодирует белок програнулин (PGRN), ассоциируется с развитием ЛВД (Baker et al., *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):916-919). Связанная с GRN форма ЛВД представляет собой протеинопатию, характеризующуюся появлением включений нейронов, содержащих убихитинизированный и фрагментированный TDP-43 (кодируемый TARDBP). Было показано, что у мышей-моделей с дефицитом PGRN, регуляция нейронной экспрессии PGRN с применением подхода генотерапии AAV корректирует поведенческие расстройства, связанные с ЛВД (Arrant et al. *Brain*. 2017; 140.5: 1447-1465).

Дефицит PGRN также ассоциируется с нейронным цероидным липофусцинозом 11 (NCL11). В частности, гомозиготные мутации в GRN связаны с нейронным цероидным липофусцинозом 11 (NCL11), который характеризуется мозжечковой атаксией, судорогами, пигментным ретинитом и когнитивными расстройствами, обычно начинающимися в возрасте от 13 до 25 лет (Faber et al. *Brain* 2020; 143(1):303-31).

Таким образом, существует веское биологическое обоснование терапевтического подхода, который позволяет увеличивать уровни PGRN в центральной нервной системе для лечения нервных заболеваний, связанных с дефицитом PGRN. Связь между дефицитом PGRN и нарушениями ЦНС, включая ЛВД и NCL11, подробно обсуждается в публикациях Mole and Cotman, *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015 г.; 1852: 2237-2241, Chitramuthu et al., *Brain* 2017; 140: 3081-3104, и Huin et al., *Brain*. 2020; 143: 303-319).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN и используемая в конструкциях нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может кодировать белок PGRN человека. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN и используемая в конструкциях нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может кодировать белок PGRN дикого типа. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN и используемая в конструкциях нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может кодировать человеческий белок PGRN дикого типа.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что для конструкций нуклеиновых кислот и векторов, содержащих промотор MeCP2, оптимизация по кодомам нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN, дает более низкие уровни экспрессии PGRN по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа, кодирующей PGRN (см. Пример 5 и фигуру 5). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, не была оптимизирована по кодомам.

Предпочтительная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, которая может быть использована в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, включает нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12. Также могут быть использованы фрагменты указанных нуклеотидных последовательностей. Такие фрагменты могут иметь длину 1000-1781 п.о., 1200-1750 п.о., 1400-1700 п.о. или 1500-1600 п.о.

Предпочтительная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, которая может быть использована в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, кодирует белок PGRN, который содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 или ее функционального варианта, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. Также могут быть использованы нуклеотиды, кодирующие фрагменты указанного белка PGRN. Такие фрагменты могут иметь длину 300-592, 350-490, 400-480 или 450-475 аминокислотных остатков.

В любом белке или в полипептиде, описанном в настоящей заявке, аминокислотная последовательность может быть модифицирована путем добавлений, делеций или замен при условии, что полипептид, имеющий модифицированную последовательность, обладает такой же активностью, как и полипептид, имеющий немодифицированную последовательность. Под словосочетанием «такой же» следует понимать, что полипептид с модифицированной последовательностью не обладает значительно пониженной активностью по сравнению с полипептидом с немодифицированной последовательностью. Такой модифицированный белок или нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный модифицированный белок, может рассматриваться как *«функциональные варианты»*.

Конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут содержать функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей описанный здесь белок PGRN. Функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN, описанный в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующей

немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN.

Конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный вариант или фрагмент описанного здесь белка PGRN. Функциональный вариант или фрагмент белка PGRN, описанный в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующего немодифицированного или полноразмерного белка PGRN.

Исследования по характеристике функции и внутриклеточных взаимодействий PGRN продолжаются и в настоящее время. Тем не менее, было обнаружено, что PGRN совместно локализуется с лизосомным маркерным белком LAMP-1 (лизосомно-ассоциированным мембранным белком 1) и играет определенную роль в регуляции лизосомной функции и биогенеза посредством подкисления лизосом (Tanaka et al., *Human Molecular Genetics*. 2017, 26(5): 969-988).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий белок PGRN, кодирует белок PGRN, который способен совместно локализоваться с LAMP-1. Совместная локализация белка PGRN, кодируемого функциональным вариантом или фрагментом, и LAMP-1 может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совместной локализации между белком PGRN, кодируемым соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью, и LAMP-1 в одних и тех же условиях. Совместная локализация белка PGRN, кодируемого функциональным вариантом или фрагментом, и LAMP-1 может быть по существу такой же как совместная локализация белка PGRN, кодируемого соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью, и LAMP-1 в одних и тех же условиях, или она может превышать такую локализацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент белка PGRN способен к совместной локализации с LAMP-1. Совместная локализация варианта фрагмента белка PGRN и LAMP-1 может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совместной локализации между соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях. Совместная локализация варианта фрагмента белка PGRN может быть по существу такой же как совместная локализация между соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях или она может превышать такую локализацию.

Совместная локализация белка PGRN и LAMP-1 может быть оценена и/или количественно определена с применением любого подходящего метода, известного специалистам в данной области. Так, например, культивируемые клетки с дефицитом

PGRN (например, GRN^{-/-}-клетки или клетки, в которых экспрессия PGRN подавляется кнРНК) могут быть трансфицированы вектором, который содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN. Затем клетки могут быть подвергнуты иммунологическому окрашиванию с использованием первого антитела, флуоресцентно меченного красителем (например, флуоресцирующим в зеленом диапазоне спектра) и специфичного к PGRN, и второго антитела, флуоресцентно меченного красителем (например, флуоресцирующим в красном диапазоне спектра) и специфичного к LAMP-1. Затем может быть оценена совместная локализация по окрашиванию в красном и зеленом диапазоне спектра с помощью флуоресцентной микроскопии (см. Tanaka et al., *Human Molecular Genetics*. 2017; 26(5): 969-988).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий белок PGRN, кодирует белок PGRN, который способен регулировать лизосомное подкисление. Регуляция лизосомного подкисления белком PGRN, кодируемым функциональным вариантом или фрагментом, может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% регуляции лизосомного подкисления белком PGRN, кодируемым соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью в одних и тех же условиях. Регуляция лизосомного подкисления белком PGRN, кодируемым функциональным вариантом или фрагментом, может быть по существу такой же как регуляция лизосомного подкисления белком PGRN, кодируемым соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью в одних и тех же условиях, и она может превышать такую регуляцию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент белка PGRN способен регулировать лизосомное подкисление. Регуляция лизосомного подкисления вариантом или фрагментом белка PGRN может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% регуляции лизосомного подкисления соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях. Регуляция лизосомного подкисления вариантом или фрагментом белка PGRN может быть по существу такой же как регуляция лизосомного подкисления соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях или она может превышать такую регуляцию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующий белок PGRN, кодирует белок PGRN, который способен усиливать лизосомное подкисление. Белок PGRN, кодируемый функциональным вариантом или фрагментом, может обладать способностью усиливать лизосомное подкисление по меньшей мере приблизительно на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от увеличения степени

лизосомного подкисления, обеспечиваемого белком PGRN, кодируемым соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью в одних и тех же условиях. Белок PGRN, кодируемый функциональным вариантом или фрагментом, может обладать способностью усиливать лизосомное подкисление до степени, которая по существу равна или превышает степень лизосомного подкисления, обеспечиваемого белком PGRN, кодируемым соответствующей немодифицированной или полноразмерной нуклеотидной последовательностью в одних и тех же условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент белка PGRN способен усиливать лизосомное подкисление. Вариант или фрагмент белка PGRN может усиливать лизосомное подкисление по меньшей мере приблизительно на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от степени лизосомного подкисления, обеспечиваемого соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях. Вариант или фрагмент белка PGRN может обладать способностью усиливать лизосомное подкисление до такой же или большей степени, чем регуляция лизосомного подкисления соответствующим немодифицированным или полноразмерным белком PGRN в одних и тех же условиях.

Влияние PGRN на лизосомное подкисление может быть оценено с применением любого подходящего метода, известного специалистам в данной области. Так, например, культивируемые клетки, дефицитные по PGRN (например, GRN^{-/-}-клетки или клетки, в которых экспрессия PGRN подавляется кнРНК), могут быть трансфицированы вектором, который содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую функциональный вариант или фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN. Подкисление лизосом в трансфицированных клетках может быть затем оценено с использованием проникающих в клетки красителей, таких как LysoSensor DND-189 или акридиновый оранжевый (см. Tanaka et al., Human Molecular Genetics. 2017; 26(5): 969-988). Увеличение флуоресценции LysoSensor DND-189 зависит от кислотности лизосом. Мономер акридинового оранжевого излучает флуоресценцию в зеленом диапазоне спектра, тогда как его димер и олигомеры образуются при протонировании. Таким образом, соотношение флуоресценции в красном/зеленом диапазоне спектра указывает на относительную кислотность лизосом. Флуоресцентный сигнал, генерируемый красителями, может быть оценен с помощью флуоресцентной микроскопии или флуоресцентного планшет-ридера.

Любое сравнение активности между последовательностями должно быть проведено с помощью одного и того же анализа. Если это не оговорено особо, то модификации полипептидной последовательности предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены означают замену аминокислот другими аминокислотами с аналогичной химической структурой, с аналогичными химическими свойствами или с аналогичным размером боковой цепи.

Введенные аминокислоты могут иметь такую же полярность, гидрофильность, гидрофобность, основность, кислотность, нейтральность или заряд, как и аминокислоты, которые они заменяют. Альтернативно, консервативная замена может вводить другую аминокислоту, которая является ароматической или алифатической, вместо ранее существовавшей ароматической или алифатической аминокислоты. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны специалистам в данной области и могут быть выбраны в соответствии со свойствами 20 главных аминокислот, как определено ниже в Таблице A1. Если аминокислоты имеют одинаковую полярность, то это можно определить по гидропатической шкале для боковых цепей аминокислот, как показано в Таблице A2.

Таблица A1 - Химические свойства аминокислот

Ala (A)	алифатический, нейтральный	гидрофобный	Met (M)	гидрофобный, нейтральный
Cys I	полярный, гидрофобный, нейтральный		Asn (N)	полярный, гидрофильный, нейтральный
Asp (D)	полярный, гидрофильный, заряженный (-)		Pro (P)	гидрофобный, нейтральный
Glu I	полярный, гидрофильный, заряженный (-)		Gln (Q)	полярный, гидрофильный, нейтральный
Phe (F)	ароматический, нейтральный	гидрофобный	Arg I (+)	полярный, гидрофильный, заряженный
Gly (G)	алифатический, нейтральный		Ser (S)	полярный, гидрофильный, нейтральный
His (H)	ароматический, полярный, гидрофильный, заряженный (+)		Thr (T)	полярный, гидрофильный, нейтральный
Ile (I)	алифатический, нейтральный	гидрофобный	Val (V)	алифатический, гидрофобный, нейтральный
Lys (K)	полярный, гидрофильный, заряженный (+)		Trp (W)	ароматический, гидрофобный, нейтральный
Leu (L)	алифатический, нейтральный	гидрофобный	Tyr (Y)	ароматический, полярный, гидрофобный

Таблица A2 - Гидропатическая шкала

Боковая цепь Гидропатия

Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

Векторы

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Вектором может быть вектор любого типа. Так, например, вектор может представлять собой плазмидный вектор или миникольцевую ДНК. Однако, обычно векторы согласно изобретению представляют собой вирусные векторы. Вирусный вектор может быть основан на вирусе простого герпеса, аденовирусе или лентивирусе. Вирусный вектор может представлять собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV) или его производное. Производное вирусного вектора может представлять собой химерное, «перетасованное» или модифицированное капсидом производное.

Вирусный вектор может содержать геном AAV природного серотипа, изолята или кладотипа AAV. Серотип AAV определяет тканевую специфичность инфекции (или тропизм) вируса AAV. Предпочтительно, AAV, используемый в настоящем изобретении, способен трансдуцировать клетки ЦНС, например, нейронные клетки, астроциты и/или олигодендроциты. Так, например, серотип AAV может представлять собой AAV2, AAV5 или AAV8, а предпочтительно, AAV2.

Эффективность генотерапии в основном зависит от адекватной и эффективной доставки донорной ДНК. Этот процесс обычно опосредован вирусными векторами. Аденоассоциированные вирусы (AAV), члены семейства парвовирусов, широко используются в генотерапии. AAV дикого типа, содержащие вирусные гены, встраивают

свой геномный материал в хромосому 19 клетки-хозяина (Kotin, et al. PNAS USA 1990. 87:2211-2215). Геном одноцепочечной ДНК AAV включает два инвертированных концевых повтора (ITR) и две открытые рамки считывания, содержащие структурные гены (*cap*) и упаковывающие гены (*rep*) (Hermonat et al., J. Virol 1984. 51:329-339). Для терапевтических целей, единственными последовательностями, необходимыми в *цис*-положении, помимо терапевтического гена, являются ITR. Таким образом, вирус AAV модифицируют, то есть, вирусные гены удаляют из генома с получением рекомбинантного AAV (rAAV). Этот вирус содержит только терапевтический ген, два ITR. Удаление вирусных генов делает rAAV неспособным к активному встраиванию своего генома в ДНК клетки-хозяина. Вместо этого, геномы rAAV присоединяются посредством ITR, образуя кольцевые эписомные структуры, или встраиваются в уже существующие хромосомные разрывы. Для продуцирования вируса, структурные и упаковывающие гены, уже удаленные из rAAV, поставляются в *транс*-ориентации в форме хелперной плазмиды. Векторы AAV ограничены относительно небольшой емкостью упаковки приблизительно 4,8 т.п.о.

Большинство векторных конструкций для генотерапии основаны на серотипе 2 AAV (AAV2). AAV2 связывается с клетками-мишенями посредством протеогликанового рецептора сульфата гепарина (Summerford and Samulski J. Virol, 1998, 72:1438-1445). Геном AAV2, как и у всех серотипов AAV, может быть заключен в ряд различных капсидных белков. AAV2 может быть упакован в свой природный капсид AAV2 (AAV2/2), или он может быть псевдотипирован другими капсидами (например, геном AAV2 в капсиде AAV1; геном AAV2/1, AAV2 в капсиде AAV5; геномы AAV2/5 и AAV2 в капсиде AAV8; AAV2/8).

Вектор согласно изобретению может содержать геном аденоассоциированного вируса (AAV) или его производное.

Геном AAV представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует функции, необходимые для продуцирования вирусной частицы AAV. Такими функциями являются функции, которые действуют в цикле репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине, включая инкапсуляцию генома AAV в вирусную частицу AAV. Встречающиеся в природе вирусы AAV являются дефицитными по репликации и зависят от наличия вспомогательных функций в *транс*-ориентации для завершения цикла репликации и упаковки. Соответственно, при дополнительном удалении генов *rep* и *cap* AAV, геном AAV вектора согласно изобретению является дефицитным по репликации.

Геном AAV может присутствовать в одноцепочечной форме, со смысловой плюс- или минус-цепью, или, альтернативно, в двухцепочечной форме. Использование двухцепочечной формы позволяет обойти стадию репликации ДНК в клетке-мишени и, таким образом, может ускорить экспрессию трансгена. Геном AAV может происходить от любого природного серотипа, изолята или кладотипа AAV. Как известно специалистам, встречающиеся в природе вирусы AAV могут быть классифицированы по различным биологическим системам.

Обычно, вирусы AAV обозначают по их серотипу. Серотип соответствует вариантному подвиду AAV, который благодаря своему профилю экспрессии поверхностных антигенов капсида обладает характерной реактивностью, которая может быть использована для того, чтобы отличить его от других вариантов подвида. Обычно, вирус, имеющий определенный серотип AAV, не дает эффективной перекрестной реакции с нейтрализующими антителами, специфичными для любого другого серотипа AAV. Серотипы AAV включают AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 (AAVγH10) и AAV11, а также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, идентифицированные в головном мозге приматов. В векторах согласно изобретению, геном может происходить от любого серотипа AAV. Капсид также может быть получен из любого серотипа AAV. Геном и капсид могут быть получены из одного и того же серотипа или различных серотипов. В векторах согласно изобретению предпочтительно, чтобы геном был получен из AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 4 (AAV4), AAV серотипа 5 (AAV5) или AAV серотипа 8 (AAV8). Более предпочтительно, чтобы геном был получен из AAV2.

Еще более предпочтительно, чтобы AAV представлял собой AAV-ТТ. AAV-ТТ подробно описан в публикациях Tordo et al., *Brain*. 2018; 141(7): 2014-2031 и WO 2015/121501, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Описание серотипов AAV можно найти у Choi et al. (*Curr Gene Ther.* 2005; 5(3); 299-310) и Wu et al. (*Molecular Therapy.* 2006; 14(3), 316-327). Последовательности геномов AAV или элементов геномов AAV, включая последовательности ITR, гены *rep* или *cap*, для использования в настоящем изобретении могут быть идентифицированы по следующим номерам доступа для последовательностей полноразмерного генома AAV: аденоассоциированный вирус 1 NC_002077, AF063497; аденоассоциированный вирус 2 NC_001401; аденоассоциированный вирус 3 NC_001729; аденоассоциированный вирус 3B NC_001863; аденоассоциированный вирус 4 NC_001829; аденоассоциированный вирус 5 Y18065,5AF085716; аденоассоциированный вирус 6 NC_001862; птичий AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; птичий штамм AAV DA-1 NC_006263, AY629583; бычий AAV NC_005889, AY388617.

Вирусы AAV могут также называться по их кладотипам или клонам. Это относится к филогенетическому родству природных AAV-вирусов и, обычно, к филогенетической группе AAV-вирусов, которая восходит к общему предку и включает всех их потомков. Кроме того, вирусы AAV могут называться по конкретному изоляту, то есть, генетическому изоляту определенного вируса AAV, встречающегося в природе. Термин «генетический изолят» означает популяцию вирусов AAV, которые были подвергнуты ограниченному генетическому смешиванию с другими встречающимися в природе вирусами AAV, что позволяет определить явно отличающиеся популяции на генетическом уровне. Примеры кладотипов и изолятов AAV, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают:

- *Кладотип А*: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609;

- *Кладотип В*: Hu 19 AY530584, Hu 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AYS30624, Hu64 AY530625, Hul3 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377;

- *Кладотип С*: Hu9 AY530629, HulO AY530576, Hull AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hul8 AY530583, Hul5 AY530580, Hul6 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hul AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623;

- *Кладотип D*: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, Cy2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013;

- *Кладотип E*: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bbl AY243023, Bb2 AY243022, RhlO AY243015, Hul7 AY530582, Hub AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pil AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rhbl AY530572, Rh52AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rhl AY530556; и

- *Кладотип F*: Hu 14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597; клональный изолят AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 15 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

Специалист в данной области может выбрать подходящий серотип, кладотип, клон или изолят AAV для использования в настоящем изобретении на основе общих знаний. Однако, следует отметить, что настоящее изобретение также охватывает использование генома AAV других серотипов, которые, возможно, еще не идентифицированы или не охарактеризованы.

Обычно, геном AAV природного серотипа, изолята или кладотипа AAV содержит по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR). Векторы согласно изобретению могут содержать два ITR, предпочтительно, по одному на каждом конце генома. Последовательность ITR действует в *цис*-ориентации, обеспечивая функциональный ориджин репликации, и позволяет интегрировать и вырезать вектор из генома клетки. Предпочтительными последовательностями ITR являются последовательности AAV2 и его варианты. Геном AAV обычно содержит гены упаковки, такие как гены гер и/или сар, которые кодируют функции упаковки для вирусной частицы AAV. Ген гер кодирует один или несколько белков Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40 или их

варианты. Ген *cap* кодирует один или несколько капсидных белков, таких как VP1, VP2 и VP3, или их варианты. Эти белки составляют капсид вирусной частицы AAV. Варианты капсида обсуждаются ниже.

Предпочтительно, геном AAV будет дериватизирован для его введения пациентам. Такая дериватизация является стандартной в данной области, и настоящее изобретение охватывает использование любого известного производного генома AAV и производных, которые могут быть получены методами, известны специалистам в данной области. Дериватизация генома AAV и капсида AAV описана в публикациях Coura and Nardi (*Virology Journal*. 2007; 4:99), а также в публикации Choi et al., упомянутой выше.

Производные генома AAV включают любые усеченные или модифицированные формы генома AAV, которые обеспечивают экспрессию трансгена Rep-1 из вектора согласно изобретению *in vivo*. Обычно, геном AAV можно значительно укоротить так, чтобы он включал минимальную вирусную последовательность, но при этом сохранял вышеуказанную функцию. Это может оказаться предпочтительным из соображений безопасности, чтобы снизить риск рекомбинации вектора с вирусом дикого типа, а также избежать запуска клеточного иммунного ответа из-за присутствия белков вирусного гена в клетке-мишени. Обычно, производное будет включать по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), предпочтительно более одного ITR, например, два ITR или более. Один или несколько ITR могут быть получены из геномов AAV, имеющих различные серотипы, или они могут быть химерными или мутантными ITR. Предпочтительным мутантным ITR является ITR с делецией *trs* (терминального сайта расщепления). Эта делеция позволяет продолжать репликацию генома с образованием одноцепочечного генома, который содержит как кодирующие, так и комплементарные последовательности, то есть, аутокомплементарный геном AAV. Это позволяет обойти репликацию ДНК в клетке-мишени и, таким образом, ускорить экспрессию трансгена.

Один или несколько ITR предпочтительно будут фланкировать конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, то есть, нуклеотидную последовательность, включающую промотор MeCP2, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок PGRN. Включение одного или нескольких ITR является предпочтительным для облегчения упаковки вектора согласно изобретению в вирусные частицы. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, элементы ITR будут единственными последовательностями, оставшимися от нативного генома AAV в производном. Таким образом, производное предпочтительно не будет включать гены *rep* и/или *cap* нативного генома и любые другие последовательности нативного генома. Это может оказаться предпочтительным по причинам, описанным выше, а также для уменьшения возможности интеграции вектора в геном клетки-хозяина. Кроме того, уменьшение размера генома AAV позволяет повысить гибкость включения других элементов последовательности (таких как регуляторные элементы) в вектор в дополнение к трансгену.

Таким образом, в отношении генома AAV2, в производном согласно изобретению могут быть удалены следующие части: одна последовательность инвертированного концевого повтора (ITR), гены репликации (*rep*) и гены капсида (*cap*). Однако, в некоторых вариантах осуществления изобретения, включая варианты осуществления изобретения *in vitro*, производные могут дополнительно включать один или несколько генов *rep* и/или *cap* или других вирусных последовательностей генома AAV. Производное может представлять собой химерное, перетасованное или модифицированное капсидом производное одного или нескольких встречающихся в природе вирусов AAV. Настоящее изобретение охватывает использование последовательностей капсидных белков различных серотипов, кладотипов, клонов или изолятов AAV в одном и том же векторе. Настоящее изобретение также охватывает упаковку генома одного серотипа в капсид другого серотипа, то есть, псевдотипирование. Химерные, перетасованные или модифицированные капсидом производные могут быть выбраны для обеспечения одной или нескольких желаемых функциональных возможностей вирусного вектора. Таким образом, эти производные могут демонстрировать повышенную эффективность доставки генов, пониженную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный диапазон тропизма и/или улучшенное нацеливание на клетки определенного типа по сравнению с вирусным вектором AAV, содержащим встречающийся в природе геном AAV, такой как AAV2. Повышение эффективности доставки генов может быть достигнуто за счет улучшения связывания рецептора или корецептора на поверхности клетки, улучшения интернализации, улучшения транспорта внутри клетки и в ядро, улучшения снятия оболочки с вирусной частицы и улучшения преобразования одноцепочечного генома в двухцепочечную форму. Повышенная эффективность может быть также связана с измененным диапазоном тропизма или нацеливанием на конкретную клеточную популяцию, так, чтобы, при введении в ткани, доза вектора не разбавлялась, где это не требуется.

Химерные капсидные белки включают белки, генерируемые посредством рекомбинации между двумя или более кодирующими капсид последовательностями природных серотипов AAV. Это может быть осуществлено, например, с применением метода «спасения» маркеров, при котором неинфекционные капсидные последовательности одного серотипа котрансфицируют капсидными последовательностями другого серотипа, и проводят направленный отбор для идентификации капсидных последовательностей, обладающих желаемыми свойствами. Капсидные последовательности различных серотипов могут быть изменены путем гомологичной рекомбинации внутри клетки с образованием новых химерных капсидных белков. Химерные капсидные белки также включают белки, созданные путем конструирования последовательностей капсидных белков для переноса специфических доменов капсидных белков, поверхностных петель или определенных аминокислотных остатков между двумя или более капсидными белками, например, между двумя или более капсидными белками различных серотипов. Перетасованные или химерные капсидные

белки также могут быть получены путем перестановки ДНК или с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. Гибридные капсидные гены AAV могут быть созданы путем случайной фрагментации последовательностей родственных генов AAV, например, тех, которые кодируют капсидные белки нескольких различных серотипов, с последующей повторной сборкой фрагментов в полимеразной реакции аутопраймирования, которая также может вызывать кроссинговеры в областях гомологии последовательностей. Библиотека гибридных генов AAV, созданная таким образом путем перетасовки капсидных генов нескольких серотипов, может быть подвергнута скринингу для идентификации вирусных клонов, обладающих желаемой функциональностью. Аналогичным образом, ПЦР с вероятностью ошибки может быть проведена для включения рандомизированной мутации генов капсида AAV в целях создания разнообразной библиотеки вариантов, которые затем могут быть отобраны на желаемые свойства.

Последовательности капсидных генов также могут быть генетически модифицированы для введения специфических делеций, замен или вставок по отношению к нативной последовательности дикого типа. В частности, гены капсида могут быть модифицированы путем встраивания последовательности неродственного белка или пептида в открытую рамку считывания последовательности, кодирующей капсид, или на N- и/или C-конце последовательности, кодирующей капсид. Неродственный белок или пептид может предпочтительно действовать как лиганд для определенного типа клеток, обеспечивая тем самым улучшенное связывание с клеткой-мишенью или повышенную специфичность нацеливания вектора на конкретную клеточную популяцию. Неродственным белком может быть также белок, который способствует очистке вирусной частицы как части производственного процесса, то есть, эпитопа или аффинной метки. Сайт инсерции обычно выбирают таким образом, чтобы он не оказывал негативного влияния на другие функции вирусной частицы, например, на интернализацию или перенос вирусной частицы. Специалист в данной области может определить подходящие сайты инсерции на основании общих знаний. Конкретные сайты раскрыты в публикации Choi et al., упомянутой выше.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает использование последовательностей генома AAV в другом порядке и в другой конфигурации, чем в нативном геноме AAV. Настоящее изобретение также охватывает замену одной или нескольких последовательностей или генов AAV последовательностями другого вируса или химерными генами, состоящими из последовательностей более, чем одного вируса. Такие химерные гены могут состоять из последовательностей двух или более родственных вирусных белков, происходящих от вирусов различных видов.

Настоящее изобретение также относится к вирусной частице AAV, содержащей вектор согласно изобретению. Частицы AAV согласно изобретению включают транскарпидированные формы, в которых геном или производное AAV, имеющие ITR одного серотипа, упакованы в капсид другого серотипа. Частицы AAV согласно

изобретению также включают мозаичные формы, в которых смесь немодифицированных капсидных белков двух или более различных серотипов составляет вирусную оболочку. Частица AAV также включает химически модифицированные формы, несущие лиганды, адсорбированные на поверхности капсида. Так, например, такие лиганды могут включать антитела для нацеливания на конкретный рецептор клеточной поверхности.

Векторы, включая векторы AAV согласно изобретению и вирусные частицы AAV согласно изобретению, могут быть получены стандартными способами, известными специалистам в области получения векторов для генотерапии. Таким образом, для приготовления подходящего векторного препарата могут быть применены хорошо зарекомендовавшие себя общедоступные методы трансфекции, упаковки и очистки.

Конструкции нуклеиновых кислот и векторы согласно изобретению, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок PGRN, обладают способностью восстанавливать потерю функции PGRN, которая может произойти, например, в результате мутаций в одном или обоих аллелях гена GRN пациента. Термин «спасение» обычно означает любое улучшение или замедление прогрессирования фенотипа, связанного с дефицитом PRGN, например, восстановление присутствия белка PGRN в головном мозге и/или уменьшение патологий нейронов.

Свойства конструкций нуклеиновых кислот и векторов согласно изобретению могут быть протестированы с применением способов, известных специалистам в данной области. Так, например, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть собрана в вектор согласно изобретению и доставлена тестируемому животному с дефицитом PRGN, такому как мышь или примат, с последующим наблюдением эффектов и их сравнением с контролем.

SEQ ID NO: 10 соответствует нуклеотидной последовательности конструкции pPG36, которая содержит промотор MeCP2_2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты или вирусный вектор согласно изобретению содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 11 соответствует нуклеотидной последовательности конструкции pPG35, которая содержит промотор MeCP2_1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты или вирусный вектор согласно изобретению содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 17 соответствует нуклеотидной последовательности AAVTT-pPG36,

то есть, геному вектора AAVTT, содержащему нуклеотидную последовательность конструкции pPG36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор согласно изобретению, такой как вектор AAV или вектор AAVTT, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 18 и 19 соответствуют нуклеотидной последовательности двух альтернативных векторных геномов AAVTT, обозначенных AAVTT-p1PG36 и AAVTT-p2PG36, соответственно. AAVTT-p1PG36 (SEQ ID NO: 18) и AAVTT-p2PG36 (SEQ ID NO: 19) содержат нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор согласно изобретению, такой как вектор AAV или вектор AAVTT содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор согласно изобретению, такой как вектор AAV или вектор AAVTT, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19.

Фармацевтические композиции и дозы

Конструкции нуклеиновых кислот и векторы согласно изобретению могут быть включены в состав фармацевтических композиций. Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектор согласно изобретению и/или вирусный вектор согласно изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого вещества может быть определена специалистом в данной области в зависимости от способа введения.

Фармацевтическая композиция может быть представлена в жидкой форме. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, нефть, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический раствор, хлорид магния,

декстроза или раствор другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях может быть использовано поверхностно-активное вещество, такое как 0,001% плюроновая кислота (PF68).

Для инъекции в участок поражения, активный ингредиент может быть получен в форме водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области могут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактат-содержащий раствор Рингера для инъекций, раствор Хартмана. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Для замедленного высвобождения, вектор может быть включен в фармацевтическую композицию, составленную для медленного высвобождения, например, в микрокапсулы, полученные из биосовместимых полимеров, или в липосомные системы-носители в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

Дозы и схемы введения доз могут быть определены специалистом-медиком с квалификацией практикующего врача, ответственного за введение композиции.

Способы терапии и применение в медицине

Настоящее изобретение также охватывает применение конструкций нуклеиновых кислот, векторов, вирусных векторов и фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, для лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента.

Таким образом, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектору согласно изобретению, вирусному вектору согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению для применения в способе лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом. Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению. Настоящее изобретение также относится к применению конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или состояния пациента, нуждающегося в этом.

Заболевание или состояние может характеризоваться дефицитом PGRN. Указанный дефицит PGRN может возникать в результате мутации с потерей функции в одном или обоих аллелях гена GRN пациента, подлежащего лечению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, к вектору согласно изобретению, к вирусному вектору согласно изобретению и/или к фармацевтической композиции согласно изобретению для

применения в способе лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN), у пациента, нуждающегося в этом. Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN), у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению. Настоящее изобретение также относится к применению конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN).

Заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, которое может быть подвергнуто лечению с использованием конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению может представлять собой заболевание центральной нервной системы (ЦНС).

Заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN и подлежащее лечению с использованием конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, может представлять собой лобно-височную деменцию (ЛВД).

Заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN и подлежащее лечению с использованием конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, может представлять собой нейронный цероидный липофуциноз типа 11 (NCL11).

Заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN и подлежащее лечению с использованием конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, может быть дополнительно охарактеризовано по лизосомной дисфункции, такой как нарушение регуляции лизосомного подкисления. Указанная лизосомная дисфункция может характеризоваться повышенными уровнями экспрессии и/или активности катепсина D, а предпочтительно, зрелого катепсина D с тяжелой и/или легкой цепью.

Пациентом, нуждающимся в лечении с использованием конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектора согласно изобретению, вирусного вектора согласно изобретению и/или фармацевтической композиции согласно изобретению, может быть мужчина или женщина. Упомянутый пациент мог быть ранее

идентифицирован как подверженный риску развития заболевания или страдающий заболеванием, характеризующимся дефицитом PGRN. Указанный пациент мог быть ранее идентифицирован как подверженный риску развития ЛВД или страдающий ЛВД. Упомянутый пациент мог быть ранее идентифицирован как подверженный риску развития NCL11 или страдающий NCL11.

Доза вектора согласно изобретению может быть определена в соответствии с различными параметрами, а особенно в соответствии с возрастом, массой тела и состоянием пациента, подлежащего лечению; а также со способом введения и необходимой схемой введения. Врач может определить необходимый способ введения и дозировку для любого конкретного пациента.

Конструкции нуклеиновых кислот, векторы, вирусные векторы или фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены в головной мозг и/или спинномозговую жидкость (СМЖ) пациента. Доставка в головной мозг может быть выбрана из внутримозговой доставки, интрапаренхиматозной доставки, доставки вовнутрь скорлупы и их комбинаций. Дополнительные области-мишени в головном мозге могут включать таламус, мозжечок, субталамическое ядро и их комбинации. Доставка в СМЖ может быть выбрана из доставки вовнутрь большой цистерны, интратекальной доставки, интрацеребровентрикулярной доставки (ICV) и их комбинаций.

Доставка в головной мозг и/или в спинномозговую жидкость (СМЖ) пациента может быть осуществлена путем инъекции. Инъекция в головной мозг может быть выбрана из внутримозговой инъекции, интрапаренхиматозной инъекции, инъекции вовнутрь скорлупы и их комбинаций. Доставка в СМЖ может быть выбрана из доставки вовнутрь большой цистерны, интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV) и их комбинаций.

Инъекция в головной мозг и/или в спинномозговую жидкость может включать доставку с усиленной конвекцией (CED). Процедура CED включает минимально инвазивное хирургическое обнажение головного мозга с последующим размещением катетеров малого диаметра непосредственно в целевую область головного мозга. CED описана, например, Debinski et al. (2009) *Expert Rev. Neurother.* 9(10):1519-27.

Доза конструкции нуклеиновой кислоты, вектора, вирусного вектора или фармацевтической композиции согласно изобретению может быть представлена в виде однократной дозы, но может быть введена повторно в случаях, когда вектор не был нацелен на нужную область. Лечение предпочтительно представляет собой однократную инъекцию, но может рассматриваться возможность повторных инъекций, например, в последующие годы и/или с различными серотипами AAV.

Клетки-хозяева

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектор согласно изобретению, вирусный вектор согласно изобретению и/или вирусную частицу AAV согласно изобретению. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, которая

продуцирует вирусный вектор согласно изобретению и/или частицу AAV согласно изобретению.

Любая подходящая клетка-хозяин может содержать конструкцию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, вектор согласно изобретению, вирусный вектор согласно изобретению и/или вирусную частицу AAV согласно изобретению. Кроме того, любая подходящая клетка-хозяин может быть использована для получения вирусного вектора согласно изобретению и/или частицы AAV согласно изобретению. Обычно, такие клетки представляют собой трансфицированные клетки млекопитающих, но также могут быть использованы и клетки других типов, например, клетки насекомых. Что касается систем продуцирования клеток млекопитающих, то для векторов AAV предпочтительными являются НЕК293 и НЕК293Т. Также могут быть использованы клетки ВНК или СНО.

Наборы

Настоящее изобретение также относится к наборам, включающим конструкции нуклеиновых кислот согласно изобретению, векторы согласно изобретению, вирусные векторы согласно изобретению и/или фармацевтические композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые, однако, не следует рассматривать как ограничение объема изобретения. Признаки, раскрытые в предшествующем описании и в следующих примерах, могут, как по отдельности, так и в любой их комбинации, представлять собой материал для реализации изобретения в различных его формах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Материалы и методы

Культуры клеток

Клетки НЕК293Т были получены из Американского Центра Сбора Тканей (ATCC, Manassas, VA, USA) и содержались в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки A549 получали от Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) и поддерживали в модифицированной по Кейну среде Хэмса F-12 (F-12K) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки CaSki были получены из ATCC (Manassas, VA, USA) и содержались в среде 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки COS-7 получали из ATCC (Manassas, VA, USA) и поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки VERO были получены от ATCC (Manassas, VA, USA) и содержались в минимальной поддерживающей среде Игла (EMEM) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки Neuro-2A были получены из ATCC (Manassas, VA, USA) и содержались в минимальной поддерживающей среде Игла (EMEM) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки NIH3T3 были получены из ATCC (Manassas, VA, USA) и содержались в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с

добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки HAP1 и клетки HAP1 с нокаутом GRN были получены от Horizon Discovery (Waterbeach, United Kingdom) и содержались в модифицированной по способу Дульбекко среде Исков (IMEM) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина.

Оптимизация по кодонам

Были созданы оптимизированные по кодонам нуклеотидные последовательности, кодирующие PGRN, с пониженным содержанием CpG. Оптимизированные по кодомам последовательности были обозначены как «CpG X», где X означает процент сайтов CpG дикого типа, оставшихся в оптимизированной по кодомам последовательности. Так, например, нуклеотидная последовательность, обозначенная как CpG 90, включает 90% сайтов CpG соответствующей последовательности дикого типа. Полученные последовательности клонировали в экспрессионный вектор.

Получение лентивирусов

Все используемые здесь лентивирусные векторы представляли собой векторы второго поколения и были получены с применением стандартных способов получения вирусов, ранее описанных Salmon, P. и D. Trono («Production and titration of lentiviral vectors». *Curr Protoc Neurosci*, 2006. Chapter 4: Unit 4.21). Вкратце, 5,7 миллиона клеток HEK293T высевали на чашку диаметром 10 см. На следующий день, клетки трансфицировали липофектаминол 2000 (ThermoFisher) с 10 мкг вектора для переноса, 3 мкг pMD2G и 8 мкг psPAX2. Среду заменяли через 12-14 часов после трансфекции. Вирусный супернатант собирали через 24 и 48 часов после этой замены среды, и в общей сложности, 20 мл вируса пропускали через 0,45 мкм-фильтр. Вирусный супернатант концентрировали до 20× в PBS с использованием концентратора Lenti-XTM (CloneTech) перед быстрой заморозкой.

Титрование лентивирусов

Все лентивирусы титровали с использованием набора для титрования с помощью кол.ОТ-ПЦР Lenti-X (Takara).

Трансдукция лентивирусом

Клетки ресуспендировали и высевали в вирусный супернатант в равной концентрации с добавлением 4 мкг/мл полибрена. Вирусный супернатант заменяли на свежую среду через 12-24 ч. Клетки Cos-8, NIH3T3, A549, CaSKi, HEK293T, SK-N-SH трансдуцировали при MOI 200. Клетки VERO и Neuro-2A трансдуцировали при MOI 1000.

Вестерн-блот-анализ

Клетки HEK293T трансфицировали представляющими интерес конструкциями с использованием липофектамина 2000 (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя. Через два дня после трансфекции, клетки лизировали в буфере RIPA (Sigma-Aldrich), дополненном коктейлем ингибиторов протеазы (Sigma-Aldrich). Концентрацию белка оценивали с использованием реагента для анализа белка BCA (ThermoFisher) и микропланшет-ридера Varioskab LUX (ThermoFisher). Лизаты смешивали с загрузочным буфером; равные количества белка анализировали на готовых

полиакриламидных гелях Mini-PROTEAN TGX 4-15% (Bio-Rad) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием системы Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad). Неспецифическое связывание антител блокировали блокирующим буфером Intercept TBS (Li-Cor) в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны инкубировали со следующими первыми антителами: с антителом против PGRN (разведение 1:200, AF2420, R&D Systems) в Intercept T20 TBS (Li-Cor) в течение ночи при 4°C; с антителом против актина (разведение 1:5000, Sigma-Aldrich, A2066) в Intercept T20 TBS (Li-Cor) в течение ночи при 4°C. Мембраны промывали TBST в течение 15 минут и инкубировали в течение 45 минут с ослиным антикозным антителом 680 RD (Li-Cor, 1:5000) и ослиным антикроличьим антителом 800 CW (Li-Cor, 1:5000) в Intercept T20 TBS, а затем промывали TBST в течение 15 минут. Мембраны визуализировали с помощью Odyssey CLx (Li-Cor).

GRN^{+/+}-клетки HAP-1 (дикого типа) и GRN^{-/-}-клетки HAP-1 (КО) трансфицировали представляющими интерес конструкциями с использованием липофектамина 2000 (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя. Через два дня после трансфекции, клетки лизировали в буфере RIPA (Sigma-Aldrich). Концентрацию белка оценивали с использованием реагента для анализа белка Pierce BCA (ThermoFisher) и мультипланшетного ридера SpectraMax i3X (Molecular Devices). Лизаты смешивали с загрузочным буфером; равные количества белка анализировали на готовых полиакриламидных гелях Mini-PROTEAN TGX 4-15% (Bio-Rad) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием системы Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad). Неспецифическое связывание антител блокировали блокирующим буфером Intercept TBS (Li-Cor) в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны инкубировали со следующими первыми антителами: с антителом против PGRN (разведение 1:200, AF2420, R&D Systems) в Intercept T20 TBS (Li-Cor) в течение ночи при 4°C; с антителом против актина (разведение 1:10000, Sigma-Aldrich, A2066) в Intercept T20 TBS (Li-Cor) в течение ночи при 4°C. Мембраны промывали TBST в течение 15 минут и инкубировали в течение 1 часа с ослиным антикозным антителом 680 RD (Li-Cor, 1:5000) и ослиным антикроличьим антителом 800 CW (Li-Cor, 1:5000) в Intercept T20 TBS, а затем промывали TBST в течение 15 минут. Мембраны визуализировали с помощью Odyssey CLx (Li-Cor).

Совместное культивирование и трансдукция нейронов-астроцитов

Первичные совместные культуры нейронов и астроцитов выделяли из эмбрионов мышей C57BL/6J на 17-й день (Janvier Labs, France). Сначала, свежееиссеченную ткань коры головного мозга диссоциировали раствором папаина (Sigma Aldrich, P4762). Клетки разводили в среде для прикрепления нейронов и высевали (10000 клеток/лунку) на 96-луночные планшеты, предварительно покрытые поли-D-лизином (CORNING 356692). Среда для прикрепления нейронов состоит из нейробазальной среды и среды (ThermoFisher Scientific, A3582901), дополненной 2,5% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой (ThermoFisher Scientific, A3840002), 1 mM пирувата натрия (ThermoFisher Scientific, 11360070), 2 mM Glutamax-100X (ThermoFisher Scientific, 35050061); среды B27 с добавками (ThermoFisher Scientific, 17504044) и 50 единиц/мл

пенициллина/стрептомицина (ThermoFisher Scientific, 15070063). Клетки поддерживали путем еженедельного добавления свежей бессывороточной нейробазальной среды. Опосредованную лентивирусами трансдукцию проводили на DIV 3 (дни *in vitro*). Лентивирусные штаммы разводили в культуральной среде и наносили поверх клеток при заданном MOI (множественности заражения), как указано в надписях к чертежам. На DIV 14, *то есть*, через 10 дней после трансдукции, клетки фиксировали и проводили иммуноцитохимический анализ.

Иммунологическое мечение и визуализация

Иммуноцитохимический анализ проводили после трансдукции в первичных нейронах и астроцитах. Клетки промывали три раза (1X PBS) с последующей фиксацией с использованием 4% PFA (ThermoFisher Scientific, 28908) в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем клетки пермеабелизировали с использованием раствора 0,25%-Triton-X/3%-BSA/1X-PBS в течение 10 минут (BSA: бычий сывороточный альбумин, VWR, 1005-30-1L; Triton-X-100 от Sigma Aldrich, T8787). После пермеабелизации, клетки блокировали раствором 3%-BSA/1X-PBS в течение 30 минут. Затем клетки метили первыми антителами (60 минут), а затем флуоресцентно конъюгированными вторыми антителами (45 минут) (см. список антител, представленный ниже). Визуализацию проводили на приборах Zeiss LSM 880 (для клеток SH-SY5Y) и Perkin Elmer Opera Phenix (для нейронов/астроцитов). Пороговую оценку и количественную оценку проводили с помощью компьютерной программы Image J или Perkin Elmer Harmony.

ПЕРВЫЕ АНТИТЕЛА				
Название	Виды-хозяева	№ по каталогу	Поставщик	Разведение
NeuN	мышь	МАБ377	Millipore	1:2500
GFAP	кролик	Z0334	DAKO	1:2500
Програнулин человека	коза	AF2420	R&D Systems	1:1000
ВТОРЫЕ АНТИТЕЛА				
Название	Виды-хозяева	№ по каталогу	Поставщик	Разведение
Антикозье антитело 550	осел	A32816	ThermoFisher	1:600
Антимышиное антитело 488	осел	A32766	ThermoFisher	1:600
Антикроличье антитело 647	осел	A32795	ThermoFisher	1:600

ELISA

Набор для ELISA на человеческий програнулин (AG-45A-0018YEK-KI01, Adipogen) использовали для количественного определения уровня секретируемого

человеческого PGRN после трансдукции совместной культуры нейронов и астроцитов мышей. Среду для культивирования клеток собирали через 10 дней после трансдукции. Образцы разводили до 1:100 и проводили ELISA в соответствии с инструкциями поставщиков. Колориметрическую реакцию проводили на стандартном планшет-ридере (Flex Station3, Molecular Devices).

Набор для ELISA на человеческий програнулин (DPGRN0, RD Systems) использовали для количественного определения уровня секретируемого человеческого програнулина после трансфекции GRN^{+/+}-клеток HAP-1 (дикого типа) и GRN^{-/-}-клеток HAP-1 (KO). Среду для культивирования клеток собирали через 24 часа после трансфекции. ELISA-анализ проводили в соответствии с инструкциями поставщиков. Колориметрическую реакцию проводили на мультипланшетном ридере SpectraMax i3X (Molecular Devices).

Срезы головного мозга, иммуногистохимический анализ и сбор

Срезы головного мозга были получены в Neuroscience Associates (Теннесси, США). Сначала, головной мозг обрабатывали в течение ночи 20% глицерином и 2% диметилсульфоксидом для предотвращения образования артефактов замораживания и заключали в желатиновую матрицу с применением технологии MultiBrain®. После отверждения, блоки быстро замораживали путем погружения в изопентан, охлажденный до -70°C, с измельченным сухим льдом, и помещали на столик для замораживания с предметным стеклом и микротомом AO860. Блоки MultiBrain® были иссечены в коронарной плоскости на расстоянии 40 мкм. Все срезы собирали последовательно в 24 контейнера на блок, которые заполняли раствором для сохранения антигена (49% PBS, pH 7,0, 50% этиленгликоль, 1% поливинилпирролидон). Неокрашенные срезы сразу помещали на хранение при -20°C.

Свободнотекущие срезы иммунохимически окрашивали с использованием антитела против человеческого програнулина (R&D - AF2420), разведенного в соотношении 1:15000. Во всех растворах для инкубирования, начиная с блокирующей сыворотки и далее, использовали забуференный Трисом физиологический раствор (TBS) с Triton X-100 в качестве носителя; все ополаскивания проводили буфером TBS. Активность эндогенной пероксидазы блокировали обработкой 0,9% перекисью водорода, а неспецифическое связывание блокировали 1,26% цельной нормальной сывороткой. После промывки, срезы окрашивали первыми антителами в течение ночи при комнатной температуре. Раствор-носитель содержал 0,3% Тритон X-100 для повышения проницаемости. После промывки, срезы инкубировали с комплексом авидин-биотин-ПХ (набор Vectatain Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) в течение одного часа при комнатной температуре. После промывки, срезы обрабатывали тетрагидрохлоридом диаминобензидина (DAB) и 0,0015% перекисью водорода для получения визуально наблюдаемого продукта реакции, помещали на желатинизированные предметные стекла (подложки), сушили на воздухе, слегка окрашивали тионином, обезвоживали в спиртах, очищали в ксилоле и покрывали покровным стеклом со средой для заливки Permount. Цифровые изображения окрашенных

срезов получали с помощью сканера предметных стекол AxioScan Z1 с 20-кратным объективом (Zeiss).

Векторы AAV

Векторы были получены от двух различных поставщиков. Соответствующие плазмидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 18 (AAVTT-p1PG36) и SEQ ID NO: 19 (AAVTT-p2PG36). Векторы AAV были получены с применением метода тройной плазмидной трансфекции, как было описано ранее в публикации Grieger et al («Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector» Molecular Therapy vol. 24 no. 2, 287-297 feb. 2016) с использованием клеток HEK 293T или HEK293 соответственно, включая хелперную плазмиду, плазмиду, кодирующую Rep/Cap, и плазмиду, содержащую SEQ ID NO: 17 (AAVTT-pPG36). На Фигуре 10 представлена схема, иллюстрирующая составные части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17.

Пример 2. Создание и оценка сконструированных промоторных конструкций

Лентивирусные векторные конструкции pAK169, pPG21, pPG35 и pPG36 были созданы, как описано выше. Все эти конструкции содержат специфичную для нейронов промоторную последовательность MeCP2, как показано на фигуре 1A. Каждая из конструкций pAK169 и pPG21 содержит минимальную промоторную последовательность MeCP2 длиной 229 п.о. (SEQ ID NO: 1).

Конструкция pPG35 (SEQ ID NO: 10) содержит сконструированную промоторную область, обозначенную MeCP2_1 (SEQ ID NO: 8). Промотор MeCP2_1 содержит минимальную промоторную последовательность (SEQ ID NO: 1) и природный интрон. Природный интрон представляет собой нуклеотидную последовательность мышинового гена MeCP2 длиной 2108 п.о. (SEQ ID NO: 9) и расположен на 5'-конце от минимальной последовательности промотора. Длина последовательности промотора MeCP2_1 составляет 2337 п.о.

Конструкция pPG36 (SEQ ID NO: 11) содержит сконструированную промоторную область, обозначенную MeCP2_2 (SEQ ID NO: 3). Промотор MeCP2_2 содержит минимальную последовательность промотора MeCP2 (SEQ ID NO: 1) и синтетический интрон длиной 2006 п.о. (SEQ ID NO: 2), который расположен на 3'-конце от минимальной последовательности промотора. Промотор MeCP2_2 имеет длину 2235 п.о. Синтетический интрон (интрон MeCP2_2; SEQ ID NO: 2) был сконструирован из двух интронных последовательностей и двух «молчащих» (то есть, неэкспрессирующих) экзонов мышинового гена MeCP2. Экзоны были подвергнуты сайленсингу путем направленной мутации для удаления старт-кодонов. На Фигуре 11 схематически показана конструкция интрона MeCP2_2 (SEQ ID NO: 2).

Сконструированный промотор MeCP2_2 в направлении с 5' по 3' содержит: минимальную последовательность промотора MeCP2 (SEQ ID NO: 1), рестрикционный сайт AgeI (ACCGGT; SEQ ID NO: 14), экзон 1 (SEQ ID NO: 5), 5'-интрон (SEQ ID NO: 6),

3'-интрон (SEQ ID NO: 7) и экзон 2 (SEQ ID NO: 8).

Также были созданы контрольные лентивирусные векторные конструкции рАК168, рРG20, рРG33 и рРG34. Каждая из этих конструкций содержит специфичную для нейронов промоторную последовательность NSE1, как показано на фигуре 2А. Конструкции рАК168 и рРG20 содержат минимальную промоторную последовательность NSE1 длиной приблизительно 1300 п.о. Конструкции рАК168 и рРG20 использовали в качестве эквивалентных контролей для рАК169 и рРG21, соответственно.

Конструкция рРG33 содержит сконструированную промоторную область, обозначенную NSE1_1, которая представляет собой минимальную промоторную последовательность, и природную последовательность человеческого гена NSE1 длиной 1100 п.о., расположенную на расстоянии 5' от минимальной промоторной последовательности. Конструкция рРG34 содержит сконструированную промоторную область, обозначенную NSE_2, которая содержит синтетический интрон длиной приблизительно 0,9 т.п.о. Конструкции рРG33 и рРG34 использовали в качестве эквивалентных контролей для рРG35 и рРG36, соответственно.

Клетки HEK293T трансфицировали каждым из векторов MeCP2 и NSE1. Экспрессию PGRN оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа. Результаты этих экспериментов показаны на фигурах 1В и 2В.

Конструкции, содержащие промоторы MeCP2, то есть, рРG21, рРG35 и рРG36, обеспечивали более высокие уровни экспрессии PGRN, чем конструкции, содержащие промоторы NSE1 (то есть, рРG20, рРG33 и рРG34).

Также было отмечено, что конструкция рРG36 (содержащая промотор MeCP2_2) обеспечивала более высокие уровни экспрессии PGRN по сравнению с конструкцией рРG21 (содержащей минимальную последовательность промотора MeCP2) и рРG35 (содержащей промотор MeCP2_1).

Пример 3. Оценка экспрессии трансгена с помощью промоторов NSE1 и MeCP2 в первичных нейронах и астроцитах

Совместные культуры первичных кортикальных нейронов и астроцитов мышей дикого типа трансдуцировали для экспрессии человеческого белка програнулина с использованием лентивируса. Лентивирусы применяли при различной множественности инфицирования (MOI), как показано на фигуре 3. Через 10 дней после трансдукции лентивирусом, клетки фиксировали и подвергали иммунологическому мечению с использованием антитела против NeuN (маркера нейронов), антитела против GFAP (маркера астроцитов) и антитела против человеческого програнулина. Процент трансдуцированных клеток показан на фигурах 3А (нейроны) и 3С (астроциты), а уровень экспрессии (интенсивность флуоресценции/клетку) показан на фигурах 3В (нейроны) и 3D (астроциты).

Было обнаружено, что конструкции, содержащие сконструированные промоторы NSE1 (рРG33 и рРG34), не изменяют эффективность трансдукции или уровень экспрессии по сравнению с конструкцией рРG20, которая содержит минимальный промотор NSE1. И

напротив, конструкции, содержащие промоторы MeCP2_1 и MeCP2_2 (pPG35 и pPG36 соответственно), повышали эффективность трансдукции или уровень экспрессии по сравнению с конструкцией pPG21, которая содержит минимальный промотор MeCP2. Примечательно, что промотор MeCP2_2 (pPG36) действовал лучше всех протестированных промоторов с точки зрения эффективности трансдукции и уровней экспрессии PGRN.

Пример 4. Оценка секреции PGRN нейронами и астроцитами, трансфицированными векторами, содержащими промоторы MeCP2

Совместные культуры первичных кортикальных нейронов и астроцитов мышей дикого типа трансдуцировали для экспрессии человеческого белка програнулина с использованием лентивирусного вектора. Лентивирусы применяли при множественности инфицирования (MOI) 20. Через 10 дней после трансдукции лентивирусом собирали культуральную среду и проводили ELISA. Результаты этого эксперимента показаны на фигуре 4. Было обнаружено, что конструкции, содержащие сконструированные промоторы MeCP2_1 и MeCP2_2 (pPG35 и pPG36, соответственно), повышают секрецию PGRN по сравнению с конструкцией, содержащей минимальный промотор MeCP2 (pPG21). Промотор MeCP2_2 (pPG36) обеспечивал самые высокие уровни экспрессии секретлируемого PGRN из всех протестированных промоторов.

Пример 5 - Оптимизация по кодомам PGRN

Неметилированные сайты CpG могут индуцировать врожденные иммунные ответы, опосредованные ловушко-подобным рецептором 9 (TLR9). Таким образом, оптимизированные по кодомам нуклеотидные последовательности, кодирующие человеческий PGRN, которые имеют пониженное содержание CpG, были созданы и клонированы в экспрессионные векторы, обозначенные CpG 0, 4, 9, 17, 25, 40, 71 и 90. Каждый из этих векторов содержит оптимизированную по кодомам нуклеотидную последовательность человеческого PGRN, имеющую пониженное содержание CpG по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа.

Уровни экспрессии PGRN оценивали для клеток HAP-1 с нокаутом GRN ($GRN^{-/-}$), трансфицированных оптимизированными по кодомам векторами, и вектор дикого типа оценивали с помощью ELISA и Вестерн-блот-анализа. Данные об уровне экспрессии показаны на фигуре 5. Было замечено, что вектор, содержащий нуклеотидную последовательность PGRN дикого типа, обеспечивает более высокий уровень экспрессии PGRN, чем все протестированные векторы, оптимизированные по кодомам.

Пример 6. Экспрессия человеческого PGRN корректирует лизосомный дефицит в первичных мышечных $GRN^{-/-}$ -нейронах

Вестерн-блот-анализ проводили для количественного определения уровня лизосомного белка катепсина D. Катепсин D представляет собой растворимую лизосомную аспартат-эндопептидазу. Незрелая форма протеолитически расщепляется с образованием зрелой активной лизосомной протеазы, которая состоит из тяжелых (~30 кДа) и легких (14 кДа) цепей, связанных нековалентными связями. Катепсин D является

маркером лизосомной дисфункции, а повышенный уровень катепсина D свидетельствует о нарушении расщепления белков и накопления грузов аутофагии.

Первичные кортикальные нейроны мыши получали от мышей дикого типа или мышей с нокаутом $GRN^{-/-}$ (КО). Через три дня после посева, нейроны трансдуцировали лентивирусными конструкциями (MOI 20) для экспрессии человеческого белка PGRN. Через десять дней после трансдукции, клетки собирали и белок экстрагировали с использованием буфера RIPA. Затем белковые лизаты подвергали Вестерн-блот-анализу для обнаружения белка катепсина D. Уровни катепсина D в Вестерн-блоте нормализовали по уровню экспрессии актина и GAPDH. Данные были взяты из трех независимых экспериментов.

По сравнению с нейронами дикого типа, в КО-нейронах в нетрансдуцированных условиях наблюдалось повышение уровня зрелого катепсина D. Опосредованная лентивирусами экспрессия hPGRN (pPG36) предотвращала созревание катепсина D. Эти результаты представлены на фигуре 6.

Пример 7. Экспрессия в ЦНС человеческого PGRN (hPGRN) у мышей дикого типа и $GRN^{-/-}$ -мышей после инъекции AAVTT-p1PG36 в полосатое тело

В полосатое тело взрослых (4-месячных) мышей дикого типа или $GRN^{-/-}$ -мышей билатерально инъецировали AAVTT-p1PG36 (AAVTT, содержащий конструкцию промотора MeCP2_2+трансген PGRN человека; SEQ ID NO: 18) или AAVTT-GFP (промотор MeCP2_2+трансген GFP) или носитель в общей дозе 2^{10} векторных геномов (вг). Животных умерщвляли через 4 недели, а затем собирали и анализировали спинномозговую жидкость, плазму и ткань головного мозга. Перед вскрытием осуществляли транскардиальную перфузию с $1 \times$ PBS. Половину головного мозга фиксировали для иммуногистохимического анализа, а другую половину использовали для биохимического анализа (FRET). Были вырезаны и заморожены различные области мозга.

ELISA и FRET-анализ

Уровни hPGRN в СМЖ и в плазме (нг/мл) оценивали с помощью ELISA (Adipogen). Высокий уровень hPGRN был обнаружен в спинномозговой жидкости (разведение 1:100) как у мышей дикого типа, так и у $GRN^{-/-}$ -мышей, которым вводили AAVTT-p1PG36 (SEQ ID NO: 18) и AAVTT-p2PG36 (SEQ ID NO: 19). Эти результаты представлены на фигурах 7A и 7C. Низкие уровни hPGRN были также обнаружены в плазме мышей (разведение 1:10). Эти результаты представлены на фигуре 7A.

FRET (Cisbio) использовали для измерения концентрации hPGRN (нг/мг) в различных областях головного мозга мышей дикого типа или $GRN^{-/-}$ -мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36. Самая высокая экспрессия hPGRN наблюдалась вблизи места инъекции (полосатое тело и средний мозг). Средние уровни экспрессии hPGRN также были обнаружены в коре и гиппокампе. Низкие уровни экспрессии hPGRN были обнаружены в отдаленных областях головного мозга, таких как ствол головного мозга, обонятельная луковица и мозжечок. Эти результаты представлены на фигуре 7B.

Иммуногистохимический анализ

ИГХ-окрашивание hPGRN наблюдалось в головном мозге GRN^{-/-}-мышей с нокаутом, которым в полосатое тело вводили AAV-p1PG36 (SEQ ID NO: 18). Специфический сигнал человеческого PGRN был обнаружен только у мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36, но не у мышей, которым инъецировали GFP. Подобно результатам FRET, в полосатом теле мышей, которым была сделана инъекция, наблюдалась сильная иммунореактивность. Иммунореактивность hPGRN также наблюдалась в областях головного мозга, удаленных от места инъекции, а именно, в таламусе, в среднем мозге, в черном вещества, в коре и в гиппокампе. Иммунореактивность клеток (зрелых клеток) преимущественно наблюдалась вблизи участка инъекции, а именно, в полосатом теле, в части коры, в части гиппокампа, в таламусе, в среднем мозге, что свидетельствует о трансдукции клеток с помощью AAVTT-p1PG36 в этих областях. Диффузное окрашивание можно было наблюдать в большинстве других областей головного мозга со снижением интенсивности от места инъекции. Это указывает на то, что hPGRN секретируется во внеклеточное пространство и диффундирует в дистальные отделы головного мозга *через* поток ISF и CSF. Результаты для GRN^{-/-}-мышей представлены на фигуре 8, но аналогичные изображения были получены и для мышей дикого типа, которым вводили AAV-p1PG36.

Иммунофлуоресценция

Было показано, что промоторы MeCP2 способны регулировать специфичную для нейронов экспрессию hPGRN *in vitro* в первичной смешанной культуре астроцитов-нейронов (см. выше Примеры 3 и 4). Чтобы определить, сохраняется ли эта нейронная специфичность у мышей *in vivo*, было проведено двойное иммунофлуоресцентное мечение срезов, полученных от мышей, которым инъецировали AAVTT-p1PG36 (SEQ ID NO: 18), для того, чтобы идентифицировать человеческий PGRN и NeuN (нейронный маркер) в соответствии с нижеследующим протоколом (все стадии осуществляли при комнатной температуре):

Срезы инкубировали вместе с нейронным маркером NeuN (1:2000; Abcam, ab177487) и с первыми антителами против человеческого програнулина (1:1000; R&D - AF2420), разведенными в PBS, содержащем 0,3% Тритон X-100, в течение ночи во влажной камере. После инкубирования, срезы трижды промывали PBS, а затем инкубировали со вторыми антикरोличьими антителами, конъюгированными с Alexa 488 и антикозьими антителами, конъюгированными с Alexa 647 (все эти антитела были разведены 1:1000 в PBS и поставлялись от Thermo Fisher) в течение 1 часа. Затем срезы подвергали контрастному окрашиванию DAPI для мечения ядер клеток и три раза промывали PBS. И наконец, срезы заливали заливочной средой, препятствующей выцветанию Prolong Gold (Life Technologies), и наносили на покровное стекло. Цифровые изображения окрашенных срезов получали с помощью сканера предметных стекол AxioScan Z1 с 20-кратным объективом (Zeiss).

Было замечено, что почти все клетки, экспрессирующие человеческий PGRN в зрелой клетке, были позитивными по NeuN. Это указывает на то, что экспрессия hGRN,

опосредованная AAVTT-p1PG36, является специфичной для нейронов *in vivo*. Экспрессия hGRN в нейронах наблюдалась во всех различных областях головного мозга, включая полосатое тело, кору, гиппокамп и таламус. Важно отметить, что экспрессия hGRN в клетках не наблюдалась в зрелых астроцитах (как было определено с помощью GFAP-окрашивания) или в микроглиальных клетках (как было определено по Iba1-окрашиванию). Таким образом, эти данные *in vivo* подтверждают вывод о том, что используемый промотор MeCP2_2 является промотором, специфичным для нейронов.

Пример 8. Экспрессия человеческого PGRN (hPGRN) влияет на активность катепсина D *in vivo* у мышей дикого типа и GRN^{-/-}-мышей после инъекции AAVTT-p1PG36 в полосатое тело.

Повышенный уровень катепсина D свидетельствует о нарушении разложения белков и накоплении грузов аутофагии. Ферментативную активность катепсина D оценивали в лизате среднего мозга мышей дикого типа (GRN^{+/+}), обработанных носителем (обозначено заштрихованными кружками), и мышей с нокаутом GRN^{-/-}, обработанных носителем или AAVTT-p1PG36 (SEQ ID NO: 18). Эти результаты представлены на фигуре 9.

Исследования *in vitro* выявили ускоренное созревание катепсина D в первичных GRN^{-/-}-нейронах, которые были восстановлены в результате экспрессии pPG36 (см. выше Пример 6). При этом, ожидается, что ускоренное созревание связано с увеличением активности катепсина D. Небольшое увеличение ферментативной активности катепсина D в различных областях головного мозга наблюдалось у молодых (4-5-месячных) GRN^{-/-}-мышей по сравнению с мышами дикого типа. Примечательно, что увеличение активности катепсина D более заметно у более старых животных (*например*, в возрасте 1 года). Таким образом, предполагается, что активность катепсина D является ранним маркером стресса у GRN^{-/-}-мышей, обнаруживаемого уже в возрасте 4-5 месяцев.

В любом случае, экспрессия hGRN, опосредованная AAVTT-p1PG36, у GRN^{-/-}-мышей в 4-месячном возрасте, приводила к снижению ферментативной активности катепсина D. Это указывает на то, что AAV-опосредованная экспрессия hPGRN, регулируемая специфичным для нейронов промотором MeCP2_2, напрямую влияет на активность катепсина D (маркер лизосомной дисфункции).

Последовательности

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Минимальный промотор MeCP2	AGCTGAATGGGTCCGCCTCTTTCCCTGCCTAAAC AGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACCC GCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACC AATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGGG GGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGC TGGTCCGGGGGGCGGGGGCGCGACGTCTGCCGTGC

		GGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGC
2	Интрон MeCP2_2	<p>gcgctccctcctctcggagagagggtgtggtaaaacccgtccgaaaTtgccc gccgctgccgccaccgccgccgccgccgccgccgagcggaggaggagga ggaggcaggaggagagactgtgagtgggaccgccaaggccgccccgggg acccttctggggggcggtagggggcgggacgtggcgccggaggggccgc ggggtcgggcgacacggctggcggTtgccgtccctcctctaccctccccctc ctctgccgccggtggtggctttctccactcgtctcccgaatcgcgagcgacggttc tcagcgcgatcctcctggagccacctcgaTtgacgccctcccgtcccccccc atctgtgcgcatcctaggccccagctgtgcaagcgccttctcgtctgggcttcgcc agttggggctgcgcgcgctcctgcccttctggggctttgggcctcggcactgtcg cgcgcccgcggtcccggcctcctcctggatcgcgctgtccccttccccctcgcgcg ccccactcccgttacttgcctccccctcacacacagactggcgcgctgcgca gtccatccccgttgggagagtgcgccacaagggtcctgagctttacccccatc tctgggttttgcctcctcctcctcctcctccattccgtgacttttccccactgcaag cgagtcggtccatcagctccattccccactggcaggaacaagttgagggttattgt ccaccacaaaaaggactagacattTgttcttaggtcccacaactcatataaag agTtggtttagttctcaggaaccgtgggcaagggactgtgcgttctcagca ctcgaagctctccgtgagaccTgcccgcagggtgctctggtctttggggTtgc tgtgctgtggctcggaaTtgagcgttcccaccctcccctcccctcctcgcca gcgttctgtctacaagaagaataggcaggtgccttgatatCgtagttgctaatC gcctatacactgttctattacctttctgtaaggatagggttttggtttggtttgg tttggccccaccctccagtttggtttagtttggtttggcatttaggttttgggggg gagtaatcttgtgtaagaccatCtgaccaagataccttttctcactgga accctaggcagcagttgctattcctgagttagcaatagtttacagtatttgaggc ctttgtccataattctcacggaatCctcagggatCagattagctgctgttgggat Caggaattgggttacaccgctgaaatcttctgctggggccttgtttgaattgaa agtcaggaggctggaacgaaggctcacaagttaacagtgccagctgctctccag aagccctggattcagtcaccatccatCgcgggtcacaaccatctgtaactca gtcccaaggggtccgaAgccctctctggctttgcctattttttattatctatCtg ttttgtcttgcctCtggcaagcccagggggccattgggtgcaactataaactgac ttctgtatCttaagaagccaaccatacagtgttacattccagaaaaaaaaatCtgc acttaacagcactagaactagggttagagaagtatCataaagggtcaaatatCttt gaccaataccagcaacctaaagctgtaagaaatcttgggccccagcttgacc caaggatacagtatcctagggaagttacaaaatcagagatagtatgcagcagcc aggggtctcatgtgtggcactcaagctcacctatactcactactgtgcagacagctg</p>

		tgftctctgtaatacttacatattgtttaataacttcagggaggaaaagtcagaagacc aggatctccagggcctca
3	Промотор MeCP2_2	AGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAA CAGACAGGAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACC GCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACC AATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTG GGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGC TGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGC GGGGTCCC GG CATCGGTTGCGCGCACCGGTgcgctcc ctcctctcggagagagggctgtggtaaaaccgctccgaaaTtggccgccgctg ccgccaccgccgccgccgccgccgagcggaggaggaggaggagc gaggaggagagactgtgagtgggaccgccaaggccgccccggggacccttg ctggggggcgggtagggcgggacgtggcggggagggggccccgccccgctg ggcgacacggctggcggTtggcgtccctcctctaccctccccctcctctgcc gccggtggtgctttctccactcgtctcccgaatcgcgagcgacggttctcagcg cgatctccctggagccaccttgaTtgacgccctcccgtgcccgccccatctgtg cgcacctaggccccagctgtgcaagcgccttgtcgtctgggcttcgccagtgg ggctgcgcgcgctcctgcccttctggggcttgggctcggcactgtcgcgcgcc cgcggtcccggcctctccctggatcgcgctgtcccctctccctcgcgcgcccc ctcccgttacttctccccctcacacacagactggcgcgctgcgcagtccat ctcccgttgggagagtgcgccacaagggtcctgagctcttaccctctctggg ttttgctccctcctcctcctcctccattccgtgactttttcccccaactgcaagcgagtc ggccaatcagctccattccccacttggcaggaacaagttgagggttattgtccacc acaaaaaggactagacattTgttcttaggtcccacaactcatcataaagagTtgg ttgtagttctcatcaggaaccgtgggcaagggactgtgcgttctcagcactcgaa gctcttccgtgagaccTtgcgccaggggtgctctggttctttggggTtgcgtgct gtggcttcggaatTtgagcgttctccaccctccctccccctccctcgcagcgttct gtctacaagaaagaataggcaggtgtccttggatatCgtagttgctaataCgcctata cactgttctattacaccttctgctaaggatagggttttggttttggtttgtttgtcc ccaccctccagtttggtttagtttggtttggcatttaggggttttgggggggagtaat atcttggtaagaccatCtgaccaagataacctttttctcactggaacccta ggcagcagttgctattccctgagtttagcaatagttttacagtatttgaggcctttgtc cataattctcacggaatCctcagggatCagattagctgctgttgggatCaggaa attgggttacaccgctgaaatctcttgcgtggggcccttgtttgaattgaaagtcag gaggctggaacgaaggctcacaagttaacagtccagctgctctccagaagccc

		<p>tggattcagteccaccaatccatCgcgggtcacaaccatctgtaacttcagtcccaa ggggtccgaAgccctctcttggtttgccctattttttatttattatCtgTTTTgtct tgtcatCtggcaagcccagggggccattgggtgcaacttataaactgacttctgtat CttaagaagccaaccatacagtgttacattccagaaaaaaatCtgccactttaa agcactagaactagggttagagaagtatCataaaggTcaaatCtttgaccaata tcaccagcaacctaaagctgttaagaaatcttgggccccagcttgaccaaggata cagtatcctaggggaagttaccaaaatcagagatagtatgcagcagccaggggtctc atgtgtggcactcaagctcacctatactactactgtgcagacagctgtgttctctgta atactfacatattgtttaacttcagggaggaaaagtcagaagaccaggatctcca gggcctca</p>
4	Интрон MeCP2_2 - экзон 1	<p>gcgctccctcctctcggagagaggctgtggtaaaaccgctccgggaaaTtggc cgccgctgccgccaccgccgccgccgccgcccgcggagcggaggaggag gaggaggcgaggaggagagact</p>
5	Интрон MeCP2_2- 5'-интрон	<p>gtgagtgggaccgccaaggccgcgggccccggacccttgcTggggggcgggta ggggcgggacgtggcgcgaggggccccgggggtcgggcgacacggctgg cggTtggcgtccctcctctaccctccccctccctctgccgccggtgggtttc tccactcgtctcccgaatcgcgagcgcgggtctcagcgcgatctccctggagcc accttgaTtgacgccctcccgtgccgccccatctgtgcgcatcctagggccc agctgtgcaagcgccttgcgtctgggcttcgccagttggggctgcgcgcgctcc tgcccttctggggctttgggctcggcactgtcgcgcgcccgggtcccggcctc tcctggatcgcgctgtccccctctccctcgcgcgccccactcccgttacttgcctc ccccacacacacagactggcgcgcgtgcgcagtcacatccccgttgggagagt gcgccacaagggtcctgagctcttaccctctctgggtttgctccctcctcctc ctctccattccgtgacttttggccccactgcaagcagtcggccatcagctccat tccccacttggcaggaacaagttaggggtattgtccaccacaaaaaggactaga cattTgttcttaggtcccacaactcatataaagagTtggttgtagttctcagc aaccgtggcaagggactgtgcgttctcagcactcgaagcttccgtgagacc TtgcccgcagggtgctctgggtctttggggTtgctgtgctgtggcttcggaatTg agcgttcccacctccctccctccctccttcgccagc</p>

6	Интрон MeCP2_2- 3'-интрон	<p>ttctgtctacaagaagaataggcaggtgccttgatCgtagttgctaCgcc tataactgttctattacaccttctgctaaggatagggttttggtttggtttggtttgt tccccacctccagtttggtttagtttggtttggcatttagggttttgggggggagt aatacttgtgtaagacccatCtgaccaagatacctttttctcactggaacc taggcagcagttgctattccctgagtagcaatagtttacagtatgttggcctttg tcataattctcacggaatCctcagggatCagattagctgctgtgggatCagga aattgggtfacaccgctgaaatcttctgctggggcccttgtttgaattgaaagtca ggaggctggaacgaaggctcacaagtaacagtccagctgctctccagaagcc ctggattcagtcaccaatccatCgcgggtcacaaccatctgtaactcagtecca aggggtccgaAgccctcttctggctttgccctattttttatcttCtgttttgc ttgtcatCtggcaagcccagggggccattgggtgcaactataaactgactctgta tCtaagaagccaaccatacagtgttacattccagaaaaaaatCtgccacttaa cagcactagaactagggttagagaagtatCataaaggtaaaatCttgaccaat atcaccagcaacctaaagctgtaagaaatcttgggcccagcttgaccaaggat acagtatcctaggaagttacaaaatcagagatagtagcagcagccaggggtct catgtgtggcactcaagctcacctatactcactactgtgcagacagctgtgtctctgt aatacttacatattgttaatacttcag</p>
7	Интрон MeCP2_2 - экзон 2	Ggaggaaaagtcagaagaccaggatctccagggcctca
8	Промотор MeCP2_1	<p>CTCTACCATTACGTTTTATCCTCAGACTCTATCTCC CCATTTTAAAGGAATATTATTTTAAATGCTACAC TCTCATTTTTTAAATGGCTCCTTTTAATTCTACTGC TAAAATACTTTTGGTACAATATGCCTTTTTTTCTAT TTTTTTTTTTAGTGCAAGTATAAAATATGTCATTT AAATCTCTTTTATCTAATTTAAGGAACTTAAGATT TTCTTCCCAAATTTTACAAGGTAGGAAAATGATG TACTTTATTTTTGTGAATGATATTGCACTGTAGATC TTGCTGTTTCTTGCTTTGTTCTCAATTAATATCAT GTTTCCTCTACAGCTTTATAGACATTTTGATCAGA TTAAGGACATTCTAATTATAGTTCTTTAAGGTGTT TTTAAATCATATGTAGGTATTGAATTTTATTTAA TGCTTTTTTCTGCATGTATTGGGATACTCACATGA TCTGTTCTTAAAATTATAATTGATTTCTAATTTTAA ACCATCCTTGCATTCGTGGAATAAACTCAGCCTG AAGGTGTGGCTGGAGAGATGGCTTGTGCTCTTGC</p>

AGAGGACCCAAGTTCAGATCCTATTCTCTGTATAT
GCAAATACCTGTATTCTCACACCCCAACATACACA
CACACACACACACACACACACACACACTACCA
CTCTTACCCACTTGTTTTTTACATTTCTATCTTAGT
ATTTTATGTGTATAAGTGTTTTGCCTGGTGCTCACT
GTGGTCAGAAGAGGGCACAGGATTCCCTGAGACT
AGAATTACAAATGGTTTAGAATGGCCATATGGGA
AATCCTCTAGATTTCCCCCACTGTAGTAAGATATT
CACTTAGGTGATCCTGTCCCAAAGTCAGCCATCAT
CCTTATTTTTTTTCTTTCTTTCCATCTGATATCCAAT
ACTTTTGGCTCAATTTTTAACATAAATCTTAACTAT
CACA ACTTATCAGATTTCAACTGCTACTGTCCTGG
TTAAAGCCTTCATCATCTATCTTTCTTCAACTGCTG
CCAGGACCTCTGGACCAGCCAGTTCTTCATTCTTC
ACTGGCAACATAGGTTTTATGGTGACAGCTAGTGA
CTCAAATATTTATCAAGGGCTTCTCATCTCAAAT
AATCTCCTAGTTCTTTTGGTGGCCTAGGTCTCTCTC
CAGTCACACTGGCCTCCTTAGTAAGGCAGGCATA
GTCCTTCCTTAGAGTGTTTAACTTGCCTAGAATG
TTTTCCCAATTACCCATATTGGGAGACGACATGA
GGGCAAAGCTAGAGGGTATCATAATAGCACTTC
TTTTGTCCTTGCCTATCTATTTCAAAGTCTTTATC
TCTGTGCAAATTTTAAAGTTCTACTTTCTTGATGT
TTAGTATGACTCTTCCTTACCAGGAGTCTAGTTTG
TCTCCTTGTTCAGTACTAAAACAGTGCCTAGCAAA
TAAATGAATAGAGAGGGGAGCCAAATTTGAATCA
GAAAGTCTCTTGTTGCATAGTGTTTAAAAAACA
CAAAGAAAGAAAGTCTCTTGTTGAGCATTGTGTTA
GCACAAAGAGCATTGGATGCTGACTGGTATCAGG
GTAAGGCTGCTTTGACAATGCTCCCTCTGGCCTCA
CTCCCTTTTATACGTACTTCCATCAAACCATCTGAT
TCAACAATGACAGACCGATCTCTTATGGGCTTGGC
ACACACCATCTGCCATTATAAACGTCTGCAAAGA
CCAAGGTTTGATATGTTGATTTTACTGTCAGCCTT
AAGAGTGCGACATCTGCTAATTTAGTGTAATAATA

		<p>CAATCAGTAGACCCTTTAAAACAAGTCCCTTGGCT TGGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTT GCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGC TGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAAC TA CTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCC TAGACTTCCTTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCC CAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCCAAAA ACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCC AAGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCTTAATTA AAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAA ACAGACAGGAACCTCGCCAATTGAGGGGCGTCAC CGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACC AATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTG GGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGC TGGTCGGGAGGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGC GGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGC</p>
9	Интрон MeCP2_1	<p>CTCTACCATTACGTTTTATCCTCAGACTCTATCTCC CCATTTTAAAGGAATATTATTTTTAAATGCTACAC TCTCATTTTTTAAATGGCTCCTTTTAATTCTACTGC TAAAATACTTTTGGTACAATATGCCTTTTTTTCTAT TTTTTTTTTTAGTGCAAGTATAAAATATGTCATTT AAATCTCTTTTATCTAATTTAAGGAAC TTAAGATT TTCTTCCCAAATTTCAACAAGGTAGGAAAATGATG TACTTTATTTTTGTGAATGATATTGCACTGTAGATC TTGCTGTTTCTTGCTTTGTTCTCAATTA AATATCAT GTTTCCTCTACAGCTTTATAGACATTTTGATCAGA TTAAGGACATTCTAATTATAGTTCTTTAAGGTGTT TTTAAAATCATATGTAGGTATTGAATTTTATTAAA TGCTTTTTTCTGCATGTATTGGGATACTCACATGA TCTGTTCTTAAAATTATAATTGATTTCTAATTTTAA ACCATCCTTGCATTCGTGGAATAAAACTCAGCCTG AAGGTGTGGCTGGAGAGATGGCTTGTTGCTCTTGC AGAGGACCCAAGTTCAGATCCTATTCTCTGTATAT GCAAATACCTGTATTCTCACACCCCAACATACACA CACACACACACACACACACACACACACTACCA</p>

	CTCTTACCCACTTGTTTTTTACATTTCTATCTTAGT ATTTTATGTGTATAAGTGTTTTGCCTGGTGCTCACT GTGGTCAGAAGAGGGCACAGGATTCCCTGAGACT AGAATTACAAATGGTTTAGAATGGCCATATGGGA AATCCTCTAGATTTCCCCCACTGTAGTAAGATATT CACTTAGGTGATCCTGTCCCAAAGTCAGCCATCAT CCTTATTTTTTTTCTTTCTTTCCATCTGATATCCAAT ACTTTTGGCTCAATTTTAAACATAAATCTTAACTAT CACAACCTTATCAGATTTCAACTGCTACTGTCCTGG TTAAAGCCTTCATCATCTATCTTTCTTCAACTGCTG CCAGGACCTCTGGACCAGCCAGTTCTTCATTCTTC ACTGGCAACATAGGTTTTATGGTGACAGCTAGTGA CTCAAATATTTATCAAGGGCTTCTCATCTCAAAT AATCTCCTAGTTCTTTTGGTGGCCTAGGTCTCTCTC CAGTCACACTGGCCTCCTTAGTAAGGCAGGCATA GTCCTTCCTTAGAGTGTTTAAACTTGCCTAGAATG TTTTCCCAATTACCCATATTGGGAGACGACATGA GGGCAAAGCTAGAGGGTATCATAATAGCACTTC TTTTGTCCTTGCCTATCTATTTCAAAGTCTTTATC TCTGTGCAAATTTTAAAGTTCTACTTTCTTGATGT TTAGTATGACTCTTCCTTACCAGGAGTCTAGTTTG TCTCCTTGTTCAGTACTAAAACAGTGCCTAGCAAA TAAATGAATAGAGAGGGGAGCCAAATTTGAATCA GAAAGTCTCTTGTTGCATAGTGTTTAAAAAACA CAAAGAAAGAAAGTCTCTTGTTGAGCATTGTGTTA GCACAAAGAGCATTGGATGCTGACTGGTATCAGG GTAAGGCTGCTTTGACAATGCTCCCTCTGGCCTCA CTCCCTTTTATACGTA CTTCATCAAACCATCTGAT TCAACAATGACAGACCGATCTCTTATGGGCTTGGC ACACACCATCTGCCATTATAAACGTCTGCAAAGA CCAAGGTTTGATATGTTGATTTTACTGTCAGCCTT AAGAGTGCGACATCTGCTAATTTAGTGTAATAATA CAATCAGTAGACCCTTTAAAACAAGTCCCTTGGCT TGGAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTT GCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGC
--	--

		<p>TGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAAC CTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCC TAGACTTCCTTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCC CAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCACAAA ACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCC AAGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCTTAATTA A</p>
10	pPG35	<p>GGCTGTGACCAGCACACCAGCTGCCCCGGTGGGGC AGACCTGCTGCCCGAGCCTGGGTGGGAGCTGGGC CTGCTGCCAGTTGCCCATGCTGTGTGCTGCGAGG ATCGCCAGCACTGCTGCCCGGCTGGCTACACCTGC AACGTGAAGGCTCGATCCTGCGAGAAGGAAGTGG TCTCTGCCCAGCCTGCCACCTTCTGGCCCGTAGC CCTCACGTGGGTGTGAAGGACGTGGAGTGTGGGG AAGGACACTTCTGCCATGATAACCAGACCTGCTGC CGAGACAACCGACAGGGCTGGGCCTGCTGTCCCT ACCGCCAGGGCGTCTGTTGTGCTGATCGGCGCCAC TGCTGTCCTGCTGGCTTCCGCTGCGCAGCCAGGGG TACCAAGTGTTTGCAGAGGGAGGCCCGCGCTGG GACGCCCCCTTGAGGGACCCAGCCTTGAGACAGC TGCTGTGAGGCCA_{aggc}CGGCCGAATTCGATATCAA GCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCT CCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCC TTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCAT TTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT TTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTG GCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCC ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCT TTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCAC GGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCT GGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC CGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCCTT GGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGC GGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAA</p>

TCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGG
CTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCG
CATCGATACCGTCGACCTCGAGACCTAGAAAAAC
ATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTAC
CAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAG
GAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGG
TACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA
GATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC
TGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGA
TATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCT
ACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
AGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCT
ACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGA
AGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTA
CACCCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGG
AGAGAGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCG
CCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATC
CGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC
CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG
TGTGAAAATCTCTAGCAGGGCCCGTTTAAACCCG
CTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTT
CTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGG
GTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCG

CTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCT
TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA
GGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTT
GACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
GTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA
AAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTG
TCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT
AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC
CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
AATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCC
GCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCC
ATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTT
ATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCT
ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCC
TAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATA
TCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAAT
TAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATA
CGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTG
ACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGT
CGCCGGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTC
GGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGC
CGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCA
GCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACAC
CCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAG
CTGTACGCCGAGTGGTTCGGAGGTTCGTGTCCACGA
ACTTCCGGGACGCCTCCGGGCGGCCATGACCGA
GATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCC
CTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACCTTCGT
GGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGAT
TTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGG

CTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTC
GCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACA
AATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG
TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG
TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAA
GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
CCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG
CATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCG
GTTTGCATATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCA
CTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGCTGCGGCGA
GCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
CTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
ACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGAT

TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT
CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCC
AGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCA
ACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
GTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT
CAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC
ATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC
TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT
CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT
GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACA
TAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAA
CGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACC
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG
CACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAA
ATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATT
ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC
AAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
GCCACCTGAC

11	pPG36	<p> CTCTGCCAGCCTGCCACCTTCCTGGCCCGTAGCC CTCACGTGGGTGTGAAGGACGTGGAGTGTGGGGA AGGACACTTCTGCCATGATAACCAGACCTGCTGCC GAGACAACCGACAGGGCTGGGCCTGCTGTCCCTA CCGCCAGGGCGTCTGTTGTGCTGATCGGCGCCACT GCTGTCCTGCTGGCTTCCGCTGCGCAGCCAGGGGT ACCAAGTGTGTTTGCAGGGAGGCCCGCGCTGGG ACGCCCCTTTGAGGGACCCAGCCTTGAGACAGCT GCTGTGAGGCCAggcCGGCCGAATTCGATATCAAG CTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG TGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTC CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTT TGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCA CTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT TCCGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTATTGCCACG GCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTG GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC GTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTG GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCG GGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT CCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGC TCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCA GACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGC ATCGATAACGTCGACCTCGAGACCTAGAAAAACA TGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACC AATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAAGAGG AGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGT ACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA GATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC TGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGA TATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCT ACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC </p>
----	-------	--

AGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCT
ACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGA
AGAAGCCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTTA
CACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGG
AGAGAGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCG
CCTAGCATTTCATCACATGGCCCGAGAGCTGCATC
CGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACC
CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG
TGTGGAAAATCTCTAGCAGGGCCCGTTTAAACCCG
CTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTT
CTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGG
GTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCG
CTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCT
TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA
GGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTT
GACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
GTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA
AAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTG
TCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT

AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC
CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
AATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCC
GCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCC
ATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTT
ATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCT
ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC
TAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATA
TCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAAT
TAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATA
CGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTG
ACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGT
CGCCGGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTC
GGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGC
CGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCA
GCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACAC
CCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAG
CTGTACGCCGAGTGGTTCGGAGGTTCGTGTCCACGA
ACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGA
GATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCC
CTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCTTCGT
GGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGAT
TTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGG
CTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGA
TCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTC
GCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACA
AATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG
TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG
TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAA
GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
CCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG

CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCG
GTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCA
CTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGA
GCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTAC
CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
ACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGAT
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT
CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCC
AGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCA

		<p>ACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA GTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT CAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC ATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACA TAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAA CGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACC GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTG CACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACC AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAA ATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATT ATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC AAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT GCCACCTGAC</p>
12	Кодирующая последовательность человеческого PGRN	<p>ATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAG CAGGGCTGGTGGCTGGAACGCGGTGCCCAGATGG TCAGTTCTGCCCTGTGGCCTGCTGCCTGGACCCCG GAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCCGTCCCCTTCTG GACAAATGGCCCACAACACTGAGCAGGCATCTGG GTGGCCCCTGCCAGGTTGATGCCCACTGCTCTGCC GGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGGGACTTC CAGTTGCTGCCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGCG GGGATGGCCATCACTGCTGCCACGGGGCTTCCAC TGCAGTGCAGACGGGCGATCCTGCTTCCAAAGAT CAGGTAACAACCTCCGTGGGTGCCATCCAGTGCCCT GATAGTCAGTTCGAATGCCCGGACTTCTCCACGTG</p>

		CTGTGTTATGGTCGATGGCTCCTGGGGGTGCTGCC CCATGCCCCAGGCTTCCTGCTGTGAAGACAGGGTG CACTGCTGTCCGCACGGTGCCTTCTGCGACCTGGT TCACACCCGCTGCATCACACCCACGGGCACCCACC CCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCAGAGGACTAA CAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTCATGTGTC CGGACGCACGGTCCCGGTGCCCTGATGGTTCTACC TGCTGTGAGCTGCCAGTGGGAAGTATGGCTGCTG CCCAATGCCAACGCCACCTGCTGCTCCGATCACC TGCACTGCTGCCCCAAGACACTGTGTGTGACCTG ATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGAACGCTA CCACGGACCTCCTACTAAGCTGCCTGCGCACACA GTGGGGGATGTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCT GCCCAGATGGCTATACCTGCTGCCGTCTACAGTCG GGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAGGCTGT GTGCTGTGAGGACCACATACTGCTGTCCC GCGG GGTTTACGTGTGACACGCAGAAGGGTACCTGTGA ACAGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGGAGAAG GCCCCAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAG CCTTGAAGAGAGATGTCCCCTGTGATAATGTCAGC AGCTGTCCCTCCTCCGATACCTGCTGCCAACTCAC GTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCAGAG GCTGTCTGCTGCTCGGACCACCAGCACTGCTGCCC CCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGGCAGTGT CAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGA GAAGATGCCTGCCC GCCGGGCTTCCTTATCCCACC CCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAGCTG CCCGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCGAGCCTGGGT GGGAGCTGGGCCTGCTGCCAGTTGCCCCATGCTGT GTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCTGCCCGGCT GGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGCG AGAAGGAAGTGGTCTCTGCCAGCCTGCCACCTTC CTGGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTGTGAAGGACG TGGAGTGTGGGGAAGGACACTTCTGCCATGATAA CCAGACCTGCTGCCGAGACAACCGACAGGGCTGG
--	--	---

		GCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGTCTGTTGTGC TGATCGGCGCCACTGCTGTCCTGCTGGCTTCCGCT GCGCAGCCAGGGGTACCAAGTGTTTGCGCAGGGA GGCCCCGCGCTGGGACGCCCTTTGAGGGACCCA GCCTTGAGACAGCTGCTGTGA
13	Аминокислотная последовательность человеческого PGRN	MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDP GGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSA GHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCS ADGRSCFQRSNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVM VDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTR CITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARS RCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQ DTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVKCD MEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIH CCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLP DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPI PEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLE KMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGG WACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKE VVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTC CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAA RGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL
14	Рестрикционный сайт AgeI (в направлении от 5' до 3')	ACCGGT
15	WPRE	TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCT ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTG TATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTT GTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGC ACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGG CATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT TCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC

		<p>ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGC TCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGT CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCC TGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTT CTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACC TTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCT CTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCG GATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA</p>
16	Сигнальная последовательность PolyA (SV40)	<p>Gatccagacatgataagatacattgatgagttggacaaaccacaactagaatgca gtgaaaaaatgctttatttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataa gctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgittcaggttcagggg gaggtgtgggaggttttag</p>
17	ААВТТ-pPG36	<p>GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTGTAAGTTAA TGATTAACCTCTGctagcAGCTGAATGGGGTCCGCCT CTTTCCCTGCCTAACAGACAGGAACTCCTGCCA ATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGC CTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGAC AAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGT GCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGC GCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTG CGCGCACCGGTgcgctccctcctcctcggagagagggtgtggtaaaac ccgtccgaaaTtggccgcccgtgccgccaccgccgccgccgccgcc gagcggaggaggaggaggaggcaggaggagagactgtgagtgggaccgcc aaggcccgggcggggacccttctggggggcgggtagggcggggacgtgg cgcgggagggggcccgggggtgggcgacacggctggcggTtggcgtccct ctctctaccctccccctcctctgccgccggtgggtttctccactcgtctccgc aatcgcgagcgacggttctcagcgcgatcctcctggagccacctcgaTtgacgc cctcccgtgcccgcccatctgtgcgcatctaggccccagctgtgcaagcgc cttctcgtctgggcttcgccagttggggctgcgcgcgctcctgccctcttggggctt tgggcctcggcactgtcgcgcgcccgggctcccggcctctccctggatcgcgctg tccccctcctcgcgcgccccactcccgttacttctccccctcacacacaca gactggcgcgctgcgcagtcctcctcccgtgggagagtgcgccacaagggt</p>

CCAGTGCCCTGATAGTCAGTTCGAATGCCCGGACT
TCTCCACGTGCTGTGTTATGGTCGATGGCTCCTGG
GGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCTGCTGTGA
AGACAGGGTGCACCTGCTGTCCGCACGGTGCCTTCT
GCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACACCCACG
GGCACCCACCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCC
AGAGGACTAACAGGGCAGTGGCCTTGTCAGCTC
GGTCATGTGTCCGGACGCACGGTCCCGGTGCCCTG
ATGGTTCTACCTGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAG
TATGGCTGCTGCCCAATGCCCAACGCCACCTGCTG
CTCCGATCACCTGCACTGCTGCCCCAAGACTG
TGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAG
GAGAACGCTACCACGGACCTCCTACTAAGCTGC
CTGCGCACACAGTGGGGGATGTGAAATGTGACAT
GGAGGTGAGCTGCCCAGATGGCTATACCTGCTGC
CGTCTACAGTCGGGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTT
TACCCAGGCTGTGTGCTGTGAGGACCACATACT
GCTGTCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGAA
GGGTACCTGTGAACAGGGGCCCCACCAGGTGCC
TGGATGGAGAAGGCCCCAGCTCACCTCAGCCTGC
CAGACCCACAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCCCTG
TGATAATGTCAGCAGCTGTCCCTCCTCCGATACT
GCTGCCAACTCACGTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGT
CCAATCCCAGAGGCTGTCTGCTGCTCGGACCACCA
GCACTGCTGCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCTG
AGGGGCAGTGTGAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGC
TGGACTGGAGAAGATGCCTGCCCGCCGGGCTTCCT
TATCCCACCCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCA
CACCAGCTGCCCGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCCG
AGCCTGGGTGGGAGCTGGGCCTGCTGCCAGTTGC
CCCATGCTGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGC
TGCCCGGCTGGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTC
GATCCTGCGAGAAGGAAGTGGTCTCTGCCAGCC
TGCCACCTTCCTGGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTG
TGAAGGACGTGGAGTGTGGGGAAGGACACTTCTG

		<p>CCATGATAACCAGACCTGCTGCCGAGACAACCGA CAGGGCTGGGCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGT CTGTTGTGCTGATCGGGGCCACTGCTGTCCTGCTG GCTTCCGCTGCGCAGCCAGGGGTACCAAGTGTTG CGCAGGGAGGCCCGCGCTGGGACGCCCTTTGA GGGACCCAGCCTTGAGACAGCTGCTGTGAGGCCA ggcCGGCCGaattcGATCCAGACATGATAAGATACAT TGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAG TGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGC TATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATA AACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATG TTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTA GGGATCCTCAGgttaatcattaactacaaggaaccctagtgatggagtt ggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggacgaccaaaggtc gcccgacgcccgggctttgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgc</p>
18	AABTT-p1PG36	<p>AATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTT TTTCTAACTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT TACGCGCGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTT TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATC AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCT AGTGTAGCCGTAGTTAGCCCACCACTTCAAGAACT CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATC CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC CGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGG TTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACC TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACA GGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGT</p>

CAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAA
 CGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCC
 TTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
 CTGATACCGCTCAAGGCTGACTGCAGGGCGAGAA
 GATTGCGAGCTGTGCGGCTGAGTTGACGTATCTGT
 GCTGGATGATTACTCATAACGGCACCGCTATCAAA
 CGTGCCACGTTTCATGTCCTACAGCGCGCTCGCTCG
 CTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTC
 GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
 ACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCTCTG
 ctagcAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCT
 AAACAGACAGGAACCTCCTGCCAATTGAGGGCGTC
 ACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACA
 ACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGG
 GTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACA
 GGCTGGTCGGGAGGGCGGGCGCGACGTCTGCCG
 TCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCACCGGTgc
 gtcctcctcctcggagagaggctgtgtaaaaccgctccgaaaTtgccgc
 cgetgccccaccgccgccgccgccgccgagcggaggaggagg
 aggcgaggaggagagactgtgagtgggaccgccaagccgccccggggac
 ccttctggggggcggtagggggcgggacgtggcgccccggggccccgg
 ggtcggcgacacggctggcggTtggcgtcctcctctaccctccccctcct
 ctgcccggtggtggtttctccactcgtctcccgaatcgcgagcagcgttctc
 agcgcgatcctctggagccaccttgaTtgacgccctcccgtgcccccact
 ctgtgcgatcctagccccagctgtcaagcgccttctcgtctgggcttccca
 gttggggctgcgcgcgctcctgccctcttggggcttgggcctcggcactgtcgc
 gcgcccggtccccgctcctcctggatcgcgctgtccccctcctcctcgcgcgc
 cccactcccgttacttgcctccccctcacacacagactggcgcgctgcgca
 gtccatctcccgttgggagagtgcgccacaaggctcctgagctttacccccatc
 tctgggttttgcctcctcctcctcctcctccattccgtgactttttccccactgcaag
 cgagtcggtccatcagctccattccccacttggcaggaacaagttgagggttattgt
 ccaccacaaaaaggactagacattTgttcttaggtccacaactcatcataaag
 agTtggttgtagttctcatcaggaaccgtgggcaagggactgtgcgttctcagca

		<p>ctcgaagctctccgtgagaccTgcccgcagggtgctctggtcttttggggTgctgtgctgtgcttcggaatTgagcgtcttcccaccctccctccctcccttgcceagcgttctgtctacaagaaagaataggcaggtgctctggataCgtagttgctaatCgcctatacactgttctattacacctttctgctaaggatagggttttggtttggtttggtttggtttccccaccctccagtttggtttagtttggtttggcatttagggtttttgggggggagtaatatcttggtaaagaccatCtgaccaagatacctttttctcatactggaaccctaggcagcagttgctatttccctgagttagcaatagttttacagtattttgaggccttttgcataaattctcacggaatCctcagggatCagattagctgctgttgggatCaggaaattgggttacaccgctgaaatcttctgctggggcccttggtttgaattggaaagtcaggaggctggaacgaaggctcacaagttaacagtgccagctgctctccagaagccctggattcagtcaccaatccatCgcggtcacaaccatctgtaactcagtccaaggggtccgaAgccctcttctggctttgccctattttatttattcttatCgtttttgtctgtcatCtggcaagcccagggggccattgggtgcaactataaactgacttctgtatCttaagaagccaaccatacagtgttacattccagaaaaaaatCtgccactttaacagcactagaactagggttagagaagatCataaaggtaaataatCttgaccaatataccagcaacctaagctgtaagaaatctttgggccccagcttgacccaaggatacagtatcctaggggaagttacaaaatcagagatagtatgcagcagccagggtctcatgtgtggaactcaagctcacctatactcactactgtgcagacagctgtttctctgtaatactfacataatttgttaatactcaggaggaaaagtcaagaagaccaggatctccagggctcaACCGGTGGCCAggCGGCCACCATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAGCAGGGCTGGTGGCTGGAACGCGGTGCCAGATGGTCAGTTCTGCCCTGTGGCCTGCTGCCTGGACCCCGGAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCCGTCCCCTTCTGGACAAATGGCCACAACTGAGCAGGCATCTGGGTGGCCCCTGCCAGGTTGATGCCCACTGCTCTGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGGGACTTCCAGTTGCTGCCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGCGGGGATGGCCATCACTGCTGCCACGGGGCTTCCACTGCAGTGCAGACGGGCGATCCTGCTTCCAAAGATCAGGTAACAACCTCCGTGGGTGCCATCCAGTGCCCTGATAGTCAGTTCGAATGCCCGGACTTCTCCACGTGCTGTGTTATGGTTCGATGGCTCCTGGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCCTGCTGTGAAGACAGGGTGCCTGCTGTCCGCACGGTGCCCTTCTGCGACCTGGTT</p>
--	--	---

CACACCCGCTGCATCACACCCACGGGCACCCACC
CCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCAGAGGACTAA
CAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTCATGTGTC
CGGACGCACGGTCCCGGTGCCCTGATGGTTCTACC
TGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTGCTG
CCCAATGCCCAACGCCACCTGCTGCTCCGATCACC
TGCACTGCTGCCCCAAGACACTGTGTGTGACCTG
ATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGAACGCTA
CCACGGACCTCCTACTAAGCTGCCTGCGCACACA
GTGGGGGATGTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCT
GCCAGATGGCTATACCTGCTGCCGTCTACAGTCG
GGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAGGCTGT
GTGCTGTGAGGACCACATACTGCTGTCCCGCGG
GGTTTACGTGTGACACGCAGAAGGGTACCTGTGA
ACAGGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGGAGAAG
GCCCCAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAG
CCTTGAAGAGAGATGTCCCCTGTGATAATGTCAGC
AGCTGTCCCTCCTCCGATACCTGCTGCCAACTCAC
GTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCAGAG
GCTGTCTGCTGCTCGGACCACCAGCACTGCTGCCC
CCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGGCAGTGT
CAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGAGA
AGATGCCTGCCCGCCGGGCTTCCTTATCCCACCCC
AGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAGCTGCC
CGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCGAGCCTGGGTGG
GAGCTGGGCCTGCTGCCAGTTGCCCCATGCTGTGT
GCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCTGCCCGGCTGG
CTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGCGAG
AAGGAAGTGGTCTCTGCCAGCCTGCCACCTTCCT
GGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTGTGAAGGACGTG
GAGTGTGGGGAAGGACACTTCTGCCATGATAACC
AGACCTGCTGCCGAGACAACCGACAGGGCTGGGC
CTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGTCTGTTGTGCTG
ATCGGCGCCACTGCTGTCCTGCTGGCTTCCGCTGC
GCAGCCAGGGGTACCAAGTGTGTTGCGCAGGGAGG

CCCC GCGCTGGGACGCCCTTTGAGGGACCCAGC
 CTTGAGACAGCTGCTGTGAGGCCAggcCGGCCGaatt
 cGATCCAGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTG
 GACAAACCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAAATG
 CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATT
 TGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAAC
 AACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCA
 GGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAGGGATCCTCA
 Ggtaatcattaactacaaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgc
 gcgctcgctcgctcactgaggccggcgaccaaaggtcgcccgagcccgggc
 tttgccccggcggectcagtgagcgagcgagcgcgcgACTGTCATTAG
 CAACTCCTTGTCCTTCGATCTCGTCAACAACAGCT
 TGCAGTTCAAATACAAGACCCAGAAGGCGACTAT
 TCTGGAAGCGAGCTTGAAGAGTTAACCTGCAGAG
 AGCCCCCGCAGTGTGACAATTAATCATCGGCATA
 GTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGG
 AAGTAAAAAATGAGCCATATCCAACGGGAAACGT
 CGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGA
 TTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCG
 GGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGG
 AAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG
 GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGA
 GATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATG
 CCACTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCC
 TGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCG
 GAAAAACAGCGTTCCAGGTATTAGAAGAATATCC
 TGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG
 TGTTCCCTGCGCCGGTTGCACTCGATTCCCTGTTTGTA
 ATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGCCTC
 GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGG
 TTGATGCGAGTGATTTTGTGATGACGAGCGTAATGGC
 TGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATA
 AACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACT
 CATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGAC
 GAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGAC

		GAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGC CATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTT CATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATT GATAATCCTGATATG
19	AABTT-p2PG36	gaagcattttgtaaaattcgcgttaaattttgtaaatcagctatttttaaccaatagg ccgaaatcggcaaaatcccttgtaaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagt gttgtccagtttgaacaagagtccactattaagaacctggactccaacgcaaa gggcgaaaaaccgtctatcagggcgtggcccactacgtgaacctcacctaac aagtttttggggtcaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaaggagcc cccgatttagacttgacggggaaaccggcgaactggcgagaaaggaaggga agaaagcgaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctg cgcgtaaccaccacaccgccgcgtaagcggcgtacagggcgctccctcg ccttcaggctcgtcagactgtactgtgagccagagttccccggcgtctccgg ctgcggtagttcaggcagttcaatcaactgttaccttgggagcgactccagaggc acttcaccgctgccagcggcttacgatccagcggcacgatccagtgcaggagat cgttatcgtatacgaacaggtattcgtggtcacttcgataaggtttgcccgata aacggaactggaaaaactgctgctggtgtttgcttccgtcagtgctggatcggcgt gcggtcggcaaaagaccagaccgttctaacagaactggcgattgttcggcgtatcg ccaaaatcaccgccgtaagccgaccacgggttcccgtttcagcaggatttaataca gcgactgatccaccagtcaccagacgaagccgccctgtaaacggggatactgac gaaacgcctgccagttatagcgaaccgccaagactgttaccgaagcgtggggc tattcgaaaaggatcagcgggcgctctcaggtagcgaagcctttttgatcg accttcggcacagccgggaaggctggtctcaaccacgcgcgctacaacgg gcaataatcgggtggccgtggtgtcggctccgcccttcaactgcaccgggc gggaaggatcgacagattgatccagcagacagcgcgctgtgattagcggcgtg gcctgattcaattcccagcagaccagtagatcacactcgggtgattacgattgcgt gcaccagtcgcgttacggttcgtcttcgccggtagccagcgggatcacggtea gacgattcgttggcacgatccgtgggttcaactggttcaaccaccactaaca ggccgtagcggtcgacagcgtgtaccacagcgggtgggttcggataatcgaacg cgcacggcgttaaagtgttctgcttcaacagcaggatattctgcacctcgtctgt cttccctaacctgaccaagcagaggatctgctcgtgacggftaatctcgaatcagca acggcttgcgttcagcagcagcagaccaagtcaatccgcacctcgcggaaacc gacaacgcaggttctgcttcaatcagcgtgccgtcggcggtgtgcagttcaacca ccgcacgatagagattcgggatttcggcgtccacagttcgggtttcagcgttca gacgtagtgtgacgcgatctgcaaacaccacgctcaacgataattcaccgccga

	<p> aaggcgcggtgccgctggcgacctgcgtttcacctgccagaagaaactgttac ccgtaggtagtcacgcaactgccgcacaactgaactcagcctccagtlacagegc ggctgaaatcgtcttaaagcgagtggaactggaaatcgtgattgtgtagtcggt ttagcagcaacgagacttcaggaaaaatccgctaaccgccacagatcctgatcttc cagataactgccgtcactccaacgcagcaccttcaccgcgaggggttttccgg cgcgtaaaaatcgtcaggtcaaattcagacggcaaacgactgtcctggccgtaa ccgaccagcgcgggtgcaccacagattgaaacgccgagtttacgcctcaaaaa taattcgcgtctggccttctgtagccagctttcacaactataatgtgagcgagtaa caaccgtcggattctccgtgggaacaaacggcggattgaccgtatagggatagg ttacgttgggtagtagggcgctccgtaaccgtgctactgccagtttgaggggacg acgacagtatcggcctcaggaagatgcactccagccagctttccggcaccgctt ctggactggaaccaggcaaaagcgcctatcgctatcaggctgcacaactgttgg gaagggcgatctgtcgggctcttcgctattacgccagcttgcgaaagggggta gtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccaggggtttccagtcacgacgttga aaacgacgggatctatcagcgtcaCATGTTCTTTCCTGCGTTAT CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT GAGTGAGCTGATACCGCTCAAGGCTGACTGCAGG GCGAGAAGATTGCGAGCTGTGCGGCTGAGTTGAC GTATCTGTGCTGGATGATTACTCATAACGGCACCG CTATCAAACGTGCCACGTTTCATGTCCTACAGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATT AACCTCTGctagcAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTT CCCTGCCTAAACAGACAGGAACTCCTGCCAATTG AGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGG GCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGC AGCACACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGAC GTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGC ACCGGTgcgctccctctctcggagagagggtgtggtaaaaccgtccgg aaaTtggccgccgctgccgccaccgccgccgccgccgcccgcgagcgga ggaggaggaggagggcaggaggagagactgtgagtgaggaccgccaaggccg cgggccccggacccttctggggggcgggtaggggcgggacgtggcgcggga </p>
--	---

		<p> ggggcccgcggggtcgggcgacacggctggcggTtggcgtccctctctctac cctccccctccctctgccgccggtgggtggcttttccactcgtctcccgaatcggg agcgacggttctcagegcgatctccctggagccaccttgaTtgacgccctcccg ctgcccgcccatctgtgcgatcctaggccccagctgtgcaagcgccttctgt ctgggcttcgccagttggggctgcgcgcgctcctgcccttcttggggctttgggcct cggcactgtcgcgcgcccgggctcccggcctctccctggatcgcgctgtccctt ctcctcgcgcgccccactcccgttacttgcctccccctcacacacagactgg cgcgcgtgcgcagtccatctcccgttgggagagtgcgccacaagggctcctgag ctcttaccatctctgggttttgcctcctcctcctctctcccattccgtgacttttg ccccactgcaagcagtcggccatcagctccattcccacttggcaggaacaa gttgagggttattgtccaccacaaaaaggactagacattTgttcttaggtccac aactcatataaagagTtgggtgtagttctcatcaggaaccgtgggcaagggactg tgcgttctcagcactcgaagctctccgtgagaccTtccccgagggtgctctgg ttctttggggTtgcgtgctgtggcttcggaatTtgagcgtctcccaccctccctcc cctccctcgccagcgttctgtctacaagaaagaataggcaggtgtccttggaatC gtagttgctaataCgcctatacactgttctattacacctttctgctaaggatagggtttt ggttttggttttggttttgtccccaccctccagtttggtttagttttggttttgacattag ggtttttgggggggagtaatatctgtggttaaagaccatCtgaccaagataacct tttctcactggaaccttaggcagcagttgctatttccctgagttagcaatagttta cagtttttagggcctttgtccataattctcacggaatCctcagggatCagattag ctgctgttgggatCaggaaattgggttacaccgctgaaatctcttggggccctt gtttgaaattgaaagtcaggaggctggaacgaaggctcacaagttaacagtcca gctgctctccagaagcctggattcagctcccaccaatccatCgcggtcacaacc atctgtaactcagtcccagggtccgaAgccctctctggctttgcctattttt attatcttatCgtttttgtctgtcatCtggcaagcccagggggccattgggtgcaa cttataaactgacttctgtatCttaagaagccaaccatacagtcttaccatccagaa aaaaaatCtgcactttaacagcactagaactagggttagagaagtatCataaag gtcaaataatCttgaccaatatacaccagcaacctaaagctgtaagaatactttgggc cccagcttgaccaagatacagtatcctaggaagttacaaaatcagagatagt atgcagcagccaggggtctcatgtgtggcactcaagctcacctatactactactgt gcagacagctgtgttctctgtaatacttacatattgtttaactcaggaggaaaa gtcagaagaccaggatctccagggcctcaACCGGTGGCCAggCGG CCACCATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTA ACAGCAGGGCTGGTGGCTGGAACGCGGTGCCAG ATGGTCAGTTCTGCCCTGTGGCCTGCTGCCTGGAC </p>
--	--	--

CCCGGAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCCGTCCCCT
TCTGGACAAATGGCCCACAACACTGAGCAGGCAT
CTGGGTGGCCCCTGCCAGGTTGATGCCACTGCTC
TGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGGGA
CTTCCAGTTGCTGCCCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCA
TGCGGGGATGGCCATCACTGCTGCCACGGGGCTT
CCACTGCAGTGCAGACGGGCGATCCTGCTTCCAA
AGATCAGGTAACAACCTCCGTGGGTGCCATCCAGT
GCCCTGATAGTCAGTTCGAATGCCCGGACTTCTCC
ACGTGCTGTGTTATGGTCGATGGCTCCTGGGGGTG
CTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCTGCTGTGAAGACA
GGGTGCACTGCTGTCCGCACGGTGCCTTCTGCGAC
CTGGTTCACACCCGCTGCATCACACCCACGGGCAC
CCACCCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCAGAGG
ACTAACAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTCAT
GTGTCCGGACGCACGGTCCCGGTGCCCTGATGGTT
CTACCTGCTGTGAGCTGCCAGTGGGAAGTATGGC
TGCTGCCCAATGCCAACGCCACCTGCTGCTCCGA
TCACCTGCACTGCTGCCCCAAGACACTGTGTGTG
ACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGAA
CGCTACCACGGACCTCCTACTAAGCTGCCTGCGC
ACACAGTGGGGGATGTGAAATGTGACATGGAGGT
GAGCTGCCCAGATGGCTATACCTGCTGCCGTCTAC
AGTCGGGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAG
GCTGTGTGCTGTGAGGACCACATACTGCTGTCC
CGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGAAGGGTACC
TGTGAACAGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGG
AGAAGGCCCCAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCC
ACAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCCCTGTGATAAT
GTCAGCAGCTGTCCCTCCTCCGATACTGCTGCCA
ACTCACGTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCC
CAGAGGCTGTCTGCTGCTCGGACCACCAGCACTGC
TGCCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGGC
AGTGTCAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACT
GGAGAAGATGCCTGCCCGCCGGGCTTCCTTATCCC

	<p> ACCCCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAG CTGCCCGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCGAGCCTG GGTGGGAGCTGGGCCTGCTGCCAGTTGCCCCATGC TGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCTGCCCGG CTGGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGC GAGAAGGAAGTGGTCTCTGCCCAGCCTGCCACCTT CCTGGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTGTGAAGGAC GTGGAGTGTGGGAAGGACACTTCTGCCATGATA ACCAGACCTGCTGCCGAGACAACCGACAGGGCTG GGCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGTCTGTTGTG CTGATCGGCGCCACTGCTGTCCTGCTGGCTTCCGC TGCGCAGCCAGGGGTACCAAGTGTTTGCGCAGGG AGGCCCCGCGCTGGGACGCCCCTTTGAGGGACCC AGCCTTGAGACAGCTGCTGTGAGGCCA_{ggc}CGGCC GaattcGATCCAGACATGATAAGATAATTGATGAGT TTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAA ATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTT ATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTA ACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTT CAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAGGGATCCT CAG_{gttaatcattaactacaaggaaccctagtgatggagtggccactcctctc} _{tgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgacc}aaaggtcgccgacgccc _{ggctttgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgc}ACTGTCATT AGCAACTCCTTGTCTTCGATCTCGTCAACAACAG CTTGCAGTTCAAATACAAGACCCAGAAGGCGACT ATTCTGGAAGCGAGCTTGAAGAGTTAACCTGCAG AGAGCCCCCGCAGTG_{tcgactgttaaccttaattaaccatttaaatcgt} _{agtgaaccgaacgcgaccgttggtcagaagccgggcaaatcagcgctggca} _{gcagtggcgtctggcggaaaacctcagtgtagcgtccccgcgcgtcccacgt} _{tgttcccggatctgaccaccagcgaatccgattttgaccgagctgggtaataag} _{cgftggcaatttaaccgccagtcaggctttcttcacagtggtgattggcgataaaaa} _{acaactgctgacgccgctgcgcgatcagttcaccggtcaccgctggataacgact} _{tggcgtaatgaagcagccgtaagaccctaacgcctgggtcgaacgctggaag} _{gcggcgggccaaccaggccgaagcagcgttggtgcagttcaccgagatacac} _{ttgctgttcggtgctgattacgaccgctcactcgtggcagcaacaggggaaaacc} </p>
--	--

	<p>ttatttatcagccgaaaacctaccggattgttgtagtggtcaataggcgattaccg ttgtgtgaagtggcgagcgatacaccgctccggcgcgattggcctgaactgcc aactggcgaggttagcagagcgggtaaactggctcggattagggccgcaagaa aactatcccgaccgcttactgccgctgtttgaccgctgggatctgccaagtacg acagtatagcccgtacgtctcccgagcgaaaacggctcgcgtgcgggacgcgc gaattgaattggcccacaccagtggcgcgggcacttccagtcaatatcagccgc tacagtgaacagcaactgttgaaaccagccttcgccaactgctgcacgcggaag aaggcactggctgaatcgcaggttccagtggggattggcgacgactcct ggagcccgtcagtatcggcggacttccaactgagcgccggcgtcacttaccag ttggtctgggtcaaaaagcgtccgcttgagtctagcgcgcgcagatctgtca tgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttctg gcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaatacgcgctcaagt cagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctgga agetccctcgtgcgtctctgttccgacctgccgttaccggatacctgtccgcc tttccctcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttc gggtgtagtctgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttccagccc accgctgcgcttatccgtaactatcgtttagtccaaccggtaagacacgact tatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtagg cgggtctacagagttctgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacag tatttggtatctgcgtctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttggtagctct tgatccggcaaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcaagcagcag attacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctg acgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaa ggatcttccactagatcctttcacgtagaaagccagtccgcagaaacgggtgctgac cccggatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgcaa agagaaaagcaggtagcttgcagtggttaccatggcgatagctagactggcggt tttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggttaaggtt gggaagccctgaaaagtaactggatggcttcttggcccaaggatctgatggcg caggggatcaagatctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcattgattgaa aagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctat gactgggcacaacagacaatcggctgctctgatccgcccgttccggctgtcag cgcagggcgccccggttctttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaa ctgcaagacgaggcagcggctatctggctggccacgacgggcttccctgc gcagctgtgctcgcggtgtcactgaagcgggaagggactggctgctattggcg aagtgccggggcaggatctctgtcatctcaccttgcctctcccagaaaagtacc</p>
--	---

белок програнулин (PGRN).

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 2-4, где: (а) по меньшей мере один интрон находится в 3'-положении от минимальной последовательности промотора; или (b) по меньшей мере один интрон находится в 5'-положении от минимальной последовательности промотора.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 2-5, где по меньшей мере один интрон является синтетическим.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по пункту 6, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей гена МЕСР2, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит, но необязательно, одну или несколько интронных последовательностей гена МЕСР2 и/или одну или более неэкспрессирующих экзонных последовательностей гена МЕСР2, где ген МЕСР2 предпочтительно представляет собой ген МЕСР2 человека.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по пункту 6 или 7, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит две интронные последовательности гена МЕСР2 человека и две неэкспрессирующие экзонные последовательности гена МЕСР2 человека.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 6-8, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит:

(а) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

(с) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; и/или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 6-9, где в направлении от 5' к 3', по меньшей мере один синтетический интрон содержит:

(а) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

(с) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; и

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 6-10, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 2-5, где по меньшей мере один интрон представляет собой природный интрон.

13. Конструкция нуклеиновой кислоты по пункту 12, где по меньшей мере один природный интрон содержит нуклеотидную последовательность гена MeCP2, а предпочтительно гена MeCP2 человека.

14. Конструкция нуклеиновой кислоты по пункту 13, где по меньшей мере один природный интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9.

15. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 2-14, где минимальная промоторная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

16. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-11, где сконструированный промотор MeCP2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3.

17. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-5 или 12-14, где сконструированный промотор MeCP2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8.

18. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-17, где промотор MeCP2 имеет длину по меньшей мере приблизительно 1000 п.о., 1500 п.о., 2000 п.о., 2100 п.о., 2150 п.о., 2175 п.о., 2200 п.о., 2210 п.о., 2220 п.о., 2230 п.о., 2240 п.о., 2250 п.о., 2260 п.о., 2280 п.о., 2290 п.о., 2300 п.о., 2310 п.о., 2320 п.о., 2330 п.о., где предпочтительно длина промотора MeCP2 составляет приблизительно 2200-2350 п.о.

19. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1, 2 или 4-18, где:
(a) белок PGRN представляет собой белок PGRN человека;

- (b) белок PGRN представляет собой белок дикого типа;
- (c) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, представляет собой нуклеотидную последовательность человека;
- (d) нуклеотидная последовательность, кодирующая белки PGRN, представляет собой нуклеотидную последовательность дикого типа;
- (e) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGN, не оптимизирована по кодонам; и/или
- (f) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, составляет по меньшей мере приблизительно 1600 п.о., 1700 п.о., 1750 п.о., 1760 п.о., 1770 п.о. или 1780 п.о., где предпочтительно длина нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN, составляет приблизительно 1780 п.о.

20. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1, 2 или 4-19, где:

нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12; и/или

белок PGRN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

21. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-20, которая дополнительно содержит:

(a) последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP), где необязательно WPRE находится в положении 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей POI или белок PGRN, и/или WPRE содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15 или его функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15;

(b) последовательность сигнала полиаденилирования, где необязательно последовательность сигнала полиаденилирования находится на 3'-конце от нуклеотидной последовательности, кодирующей POI или белок PGRN, и/или где последовательность сигнала полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16; или

(c) (a) и (b), представленные выше, где необязательно в направлении от 5' к 3', конструкция нуклеиновой кислоты содержит промотор MeCP2, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок POI или PGRN, WPRE и последовательность сигнала полиаденилирования.

22. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-21, имеющая длину от 3700 до 4700 п.о., от 3800 до 4800 п.о., от 3900 до 4700 п.о., от 4000 до 4600 п.о., от 4000 до 4500 п.о., от 4000 до 4400 п.о., от 4000 до 4300 п.о., или от 4000 до 4200 п.о.

23. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, определенную в любом из пунктов 1-22.

24. Вектор по пункту 23, который представляет собой плазмидный или вирусный вектор.

25. Вектор по пункту 23 или 24, который представляет собой вирусный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность:

(a) SEQ ID NO: 11 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11; или

(b) SEQ ID NO: 10 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

26. Вектор по любому из пунктов 23-25, который представляет собой вирусный вектор, выбранный из: (a) вектора аденоассоциированного вируса (AAV), или который содержит геном AAV или его производное, где необязательно указанное производное представляет собой химерное, перетасованное или модифицированное капсидом производное; или (b) лентивирусного вектора, или который содержит геном лентивируса или его производное.

27. Вирусный вектор по пункту 26, который представляет собой вектор AAV, содержащий геном, происходящий от AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 3 (AAV3), AAV серотипа 4 (AAV4), AAV серотипа 5 (AAV5), AAV серотипа 6 (AAV6), AAV серотипа 7 (AAV7), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9) или AAV серотипа rh10 (AAVrh10), где предпочтительно AAV содержит геном, происходящий от AAV2, AAV9 или AAVrh10.

28. Вектор AAV по пункту 27, где вектор AAV содержит геном, происходящий от AAV2, и где предпочтительно AAV представляет собой AAV-ТТ.

29. Клетка-хозяин, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты согласно любому из пунктов 1-22 и/или вектор согласно любому из пунктов 23-28, и/или которая продуцирует вирусный вектор согласно любому из пунктов 25-28, где необязательно клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293 или клетку HEK293Т.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты согласно любому из пунктов 1-22, вектор согласно пунктам 23 или 24 и/или вирусный вектор согласно любому из пунктов 25-28 вместе с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем.

31. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-22, вектор по пунктам 23 или 24, вирусный вектор по любому из пунктов 25-28, и/или фармацевтическая композиция по пункту 30 для применения в способе лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

32. Способ лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN), у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества

конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-22, вектора по пунктам 23 или 24, вирусного вектора по любому из пунктов 25-28, и/или фармацевтической композиции по пункту 30.

33. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-22, вектора по пунктам 23 или 24, вирусного вектора по любому из пунктов 25-28, и/или фармацевтической композиции по пункту 30 в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

34. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения по пункту 31, способ по пункту 32 или применение по пункту 33, где:

заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, представляет собой заболевание центральной нервной системы;

заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, вызывается дефицитом PGRN в нейронах и/или астроцитах пациента;

у пациента имеется мутация с потерей функции по меньшей мере в одном аллеле гена GRN; и/или

у пациента имеется мутация с потерей функции по меньшей мере в обоих аллелях гена GRN.

35. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения согласно пунктам 31 или 34, способ по пункту 32 или 34 или применение по пункту 33 или 34, где заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, представляет собой лобно-височную деменцию (ЛВД) или нейронный цероидный липофусциноз 11 типа (NCL11).

36. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения согласно пунктам 31, 34 или 35, способ по пунктам 32, 34 или 35 или применение по любому из пунктов 33-35, где указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическую композицию вводят пациенту путем доставки в головной мозг и/или в спинномозговую жидкость (СМЖ) пациента, где доставку осуществляют, но необязательно, путем инъекции в:

(i) головной мозг пациента, где предпочтительно инъекция в головной мозг выбрана из внутримозговой инъекции, интрапаренхиматозной инъекции, инъекции вовнутрь скорлупы и их комбинаций; и/или

(ii) в СМЖ пациента, где предпочтительно инъекция в СМЖ выбрана из инъекции в большую цистерну, интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции и их комбинаций.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая промотор белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2), функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок програнулин (PGRN).

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 1, где промотор MeCP2 представляет собой сконструированный промотор MeCP2, содержащий минимальную промоторную последовательность и по меньшей мере один интрон.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая сконструированный промотор белка 2, связывающегося с метил-CpG (MeCP2), функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющий интерес белок (POI), где сконструированный промотор MeCP2 содержит минимальную промоторную последовательность и по меньшей мере один интрон.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 3, где POI представляет собой белок програнулин (PGRN).

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 2-4, где: (а) по меньшей мере один интрон находится в 3'-положении от минимальной последовательности промотора; или (b) по меньшей мере один интрон находится в 5'-положении от минимальной последовательности промотора.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 2-5, где по меньшей мере один интрон является синтетическим.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 6, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей гена MECР2, где необязательно по меньшей мере один синтетический интрон содержит одну или несколько интронных последовательностей гена MECР2 и/или одну или более неэкспрессирующих экзонных последовательностей гена MECР2, где предпочтительно ген MECР2 представляет собой мышинный или человеческий ген MECР2, и более предпочтительно ген MECР2 представляет собой мышинный ген MECР2.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 6 или 7, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит две интронные последовательности мышинного гена MECР2 и две неэкспрессирующие экзонные последовательности мышинного гена MECР2.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-8, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит:

(а) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

(с) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или нуклеотидную последовательность, которая по

меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; и/или

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-9, где, в направлении от 5' к 3', по меньшей мере один синтетический интрон содержит:

(a) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4;

(b) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

(c) интронную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6; и

(d) неэкспрессирующую экзонную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-10, где по меньшей мере один синтетический интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 2-5, где по меньшей мере один интрон представляет собой природный интрон.

13. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 12, где по меньшей мере один природный интрон содержит нуклеотидную последовательность гена MeCP2, предпочтительно мышинового или человеческого гена MeCP2.

14. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 13, где по меньшей мере один природный интрон содержит нуклеотидную последовательность мышинового гена MeCP2.

15. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 14, где по меньшей мере один природный интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9.

16. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 2-15, где минимальная промоторная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

17. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-11, где сконструированный промотор MeCP2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3.

18. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 или 12-15, где сконструированный промотор MeCP2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8.

19. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-18, где промотор MeCP2 имеет длину по меньшей мере приблизительно 1000 п.о., 1500 п.о., 2000 п.о., 2100 п.о., 2150 п.о., 2175 п.о., 2200 п.о., 2210 п.о., 2220 п.о., 2230 п.о., 2240 п.о., 2250 п.о., 2260 п.о., 2280 п.о., 2290 п.о., 2300 п.о., 2310 п.о., 2320 п.о., 2330 п.о., где предпочтительно длина промотора MeCP2 составляет приблизительно 2200-2350 п.о.

20. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1, 2 или 4-19, где:

(a) белок PGRN представляет собой белок PGRN человека;

(b) белок PGRN представляет собой белок дикого типа;

(c) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, представляет собой нуклеотидную последовательность человека;

(d) нуклеотидная последовательность, кодирующая белки PGRN, представляет собой нуклеотидную последовательность дикого типа;

(e) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGN, не оптимизирована по кодонам; и/или

(f) нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, составляет по меньшей мере приблизительно 1600 п.о., 1700 п.о., 1750 п.о., 1760 п.о., 1770 п.о. или 1780 п.о., где предпочтительно длина нуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN, составляет приблизительно 1780 п.о.

21. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1, 2 или 4-20, где:

нуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12; и/или

белок PGRN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

22. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21, которая дополнительно содержит:

(a) последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP), где необязательно, WPRE находится в положении 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей POI или белок PGRN, и/или WPRE содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15 или его

функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15;

(b) последовательность сигнала полиаденилирования, где необязательно последовательность сигнала полиаденилирования находится на 3'-конце от нуклеотидной последовательности, кодирующей POI или белок PGRN, и/или где последовательность сигнала полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 90% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16; или

(c) (a) и (b), представленные выше, где необязательно в направлении от 5' к 3', конструкция нуклеиновой кислоты содержит промотор MeCP2, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок POI или PGRN, WPRE и последовательность сигнала полиаденилирования.

23. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-22, имеющая длину от 3700 до 4700 п.о., от 3800 до 4800 п.о., от 3900 до 4700 п.о., от 4000 до 4600 п.о., от 4000 до 4500 п.о., от 4000 до 4400 п.о., от 4000 до 4300 п.о., или от 4000 до 4200 п.о.

24. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23.

25. Вектор по п. 24, который представляет собой плазмидный или вирусный вектор.

26. Вектор по п. 24 или 25, который представляет собой вирусный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность:

(a) SEQ ID NO: 11 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 11; или

(b) SEQ ID NO: 10 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

27. Вектор по любому из пп. 24-26, который представляет собой вирусный вектор, выбранный из: (a) вектора аденоассоциированного вируса (AAV), или который содержит геном AAV или его производное, где необязательно указанное производное представляет собой химерное, перетасованное или модифицированное капсидом производное; или (b) лентивирусного вектора, или который содержит геном лентивируса или его производное.

28. Вирусный вектор по п. 27, который представляет собой вектор AAV, содержащий геном, происходящий от AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 3 (AAV3), AAV серотипа 4 (AAV4), AAV серотипа 5 (AAV5), AAV серотипа 6 (AAV6), AAV серотипа 7 (AAV7), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9) или AAV серотипа rh10 (AAVrh10), где предпочтительно AAV содержит геном, происходящий от AAV2, AAV9 или AAVrh10.

29. Вектор AAV по п. 28, где вектор AAV содержит геном, происходящий от AAV2, и где предпочтительно AAV представляет собой AAV-ТТ.

30. Вектор AAV по п. 28 или 29, где вектор AAV содержит нуклеотидную последовательность, которая, в направлении от 5' к 3', содержит один или более из:

- (a) 5'-ITR;
- (b) 5'-смежного фрагмента;
- (c) минимальной последовательности промотора MeCP2;
- (d) по меньшей мере одного синтетического интрона;
- (e) последовательности Козак;
- (f) полинуклеотидной последовательности, кодирующей белок PGRN;
- (g) последовательности poly(A) SV40;
- (h) 3'- смежного фрагмента; и
- (i) 3'-ITR.

31. Вектор AAV по п. 30, где:

(a) 5'-ITR содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 20;

(b) 5'-смежный фрагмент содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 21 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 21;

(c) минимальная последовательность промотора MeCP2 содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 1;

(d) по меньшей мере один синтетический интрон содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 2;

(e) последовательность Козак содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 24;

(f) полинуклеотидная последовательность, кодирующая белок PGRN, содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 12;

(g) poly(A)-последовательность SV40 содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 16;

(h) 3'-смежный фрагмент содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 22 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 22; и/или

(i) 3'-ITR содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 23 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен SEQ ID NO: 23.

32. Вектор AAV по любому из пп. 29-31, где вектор AAV содержит нуклеотидную

последовательность SEQ ID NO: 17 или ее функциональный вариант или фрагмент, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17.

33. Вектор AAV по любому из пп. 29-32, где вектор AAV содержит нуклеотидную последовательность или состоит из нуклеотидной последовательности:

(a) SEQ ID NO: 18 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18; или

(b) SEQ ID NO: 19 или ее функционального варианта или фрагмента, который по меньшей мере на 70% идентичен нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19.

34. Клетка-хозяин, которая содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23 и/или вектор по любому из пп. 24-33, и/или которая продуцирует вирусный вектор по любому из пп. 26-33, где необязательно клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293 или клетку HEK293T.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, вектор по п. 24 или 25 и/или вирусный вектор по любому из пп. 26-33 вместе с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем.

36. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, вектор по п. 24 или 25, вирусный вектор по любому из пп. 26-33 и/или фармацевтическая композиция по п. 35 для применения в способе лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

37. Способ лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN), у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, вектора по п. 24 или 25, вирусного вектора по любому из пп. 26-33 и/или фармацевтической композиции по п. 35.

38. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, вектора по п. 24 или 25, вирусного вектора по любому из пп. 26-33 и/или фармацевтической композиции по п. 35 в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, характеризующегося дефицитом програнулина (PGRN) у пациента, нуждающегося в этом.

39. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения по п. 36, способ по п. 37 или применение по п. 38, где:

заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, является заболеванием центральной нервной системы;

заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, вызывается дефицитом PGRN в нейронах и/или астроцитах пациента;

у пациента имеется мутация с потерей функции по меньшей мере в одном аллеле гена GRN; и/или

у пациента имеется мутация с потерей функции в обоих аллелях гена GRN.

40. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения по п. 36 или 39, способ по п. 37 или 39 или применение по п. 38 или 39, где заболевание, характеризующееся дефицитом PGRN, представляет собой лобно-височную деменцию (ЛВД) или нейронный цероидный липофусциноз типа 11 (NCL11).

41. Конструкция нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическая композиция для применения по пп. 36, 39 или 40, способ по пп. 37, 39 или 40, или применение по любому из пп. 38-40, где указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, вектор, вирусный вектор или фармацевтическую композицию вводят пациенту путем доставки в головной мозг и/или в спинномозговую жидкость (СМЖ) пациента, где доставку осуществляют, но необязательно, путем инъекции в:

(i) головной мозг пациента, где предпочтительно инъекция в головной мозг выбрана из внутримозговой инъекции, интрапаренхиматозной инъекции, инъекции вовнутрь скорлупы и их комбинаций; и/или

(ii) в СМЖ пациента, где предпочтительно инъекция в СМЖ выбрана из инъекции в большую цистерну, интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции и их комбинаций.

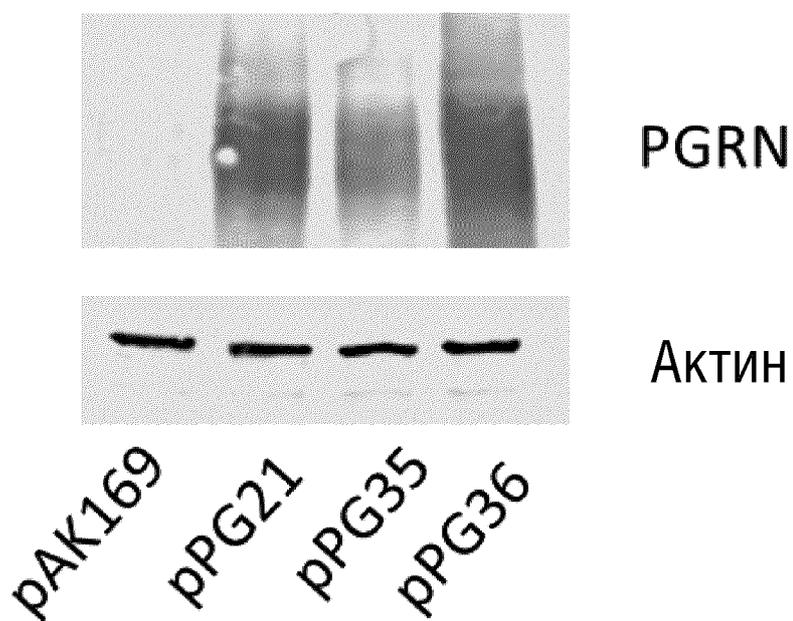
По доверенности

ФИГ.1

А



В

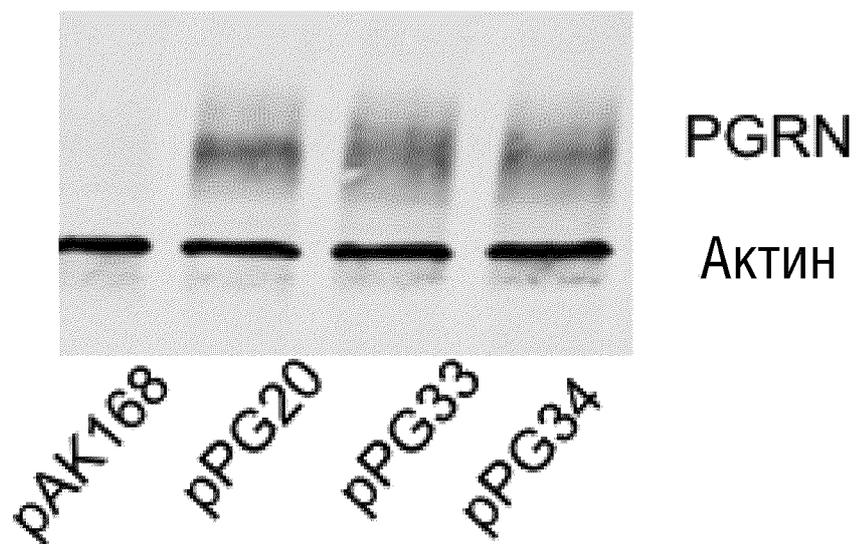


ФИГ.2

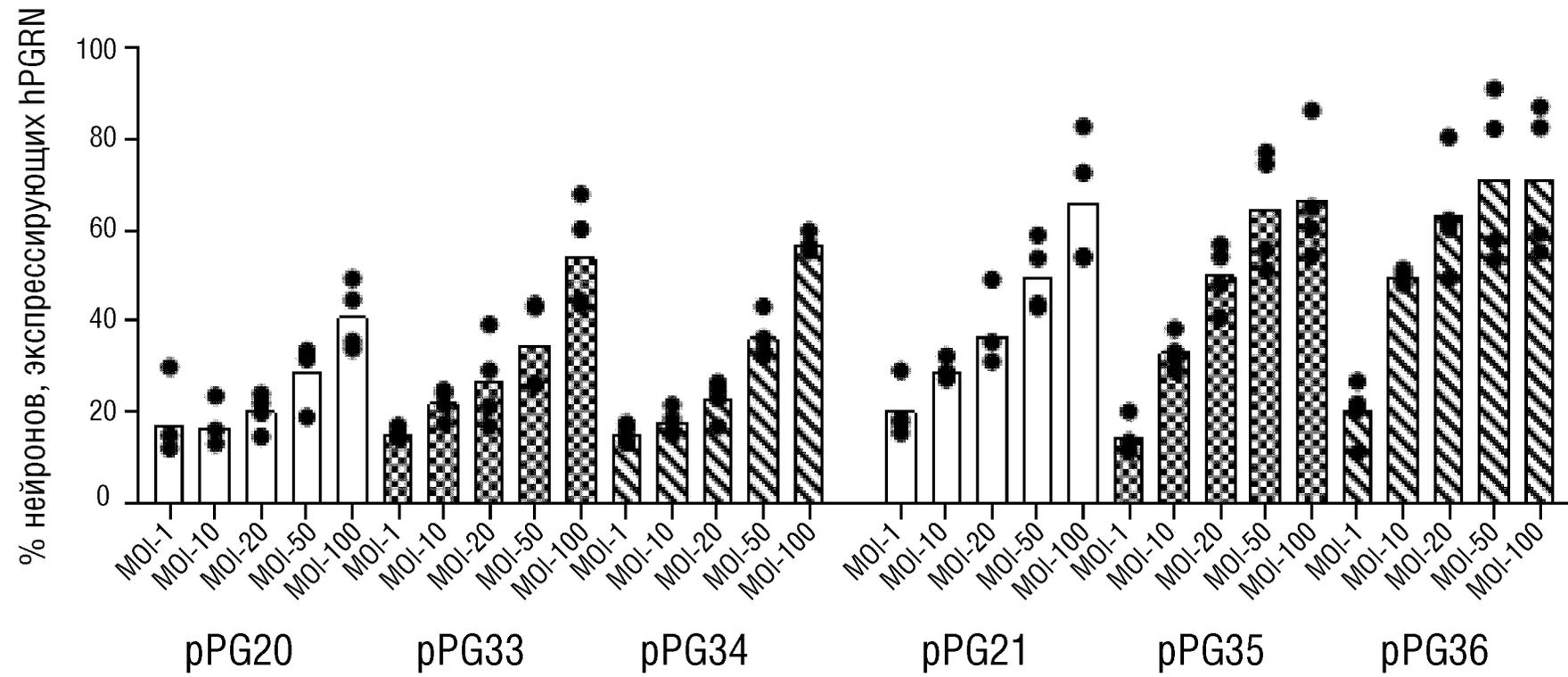
A



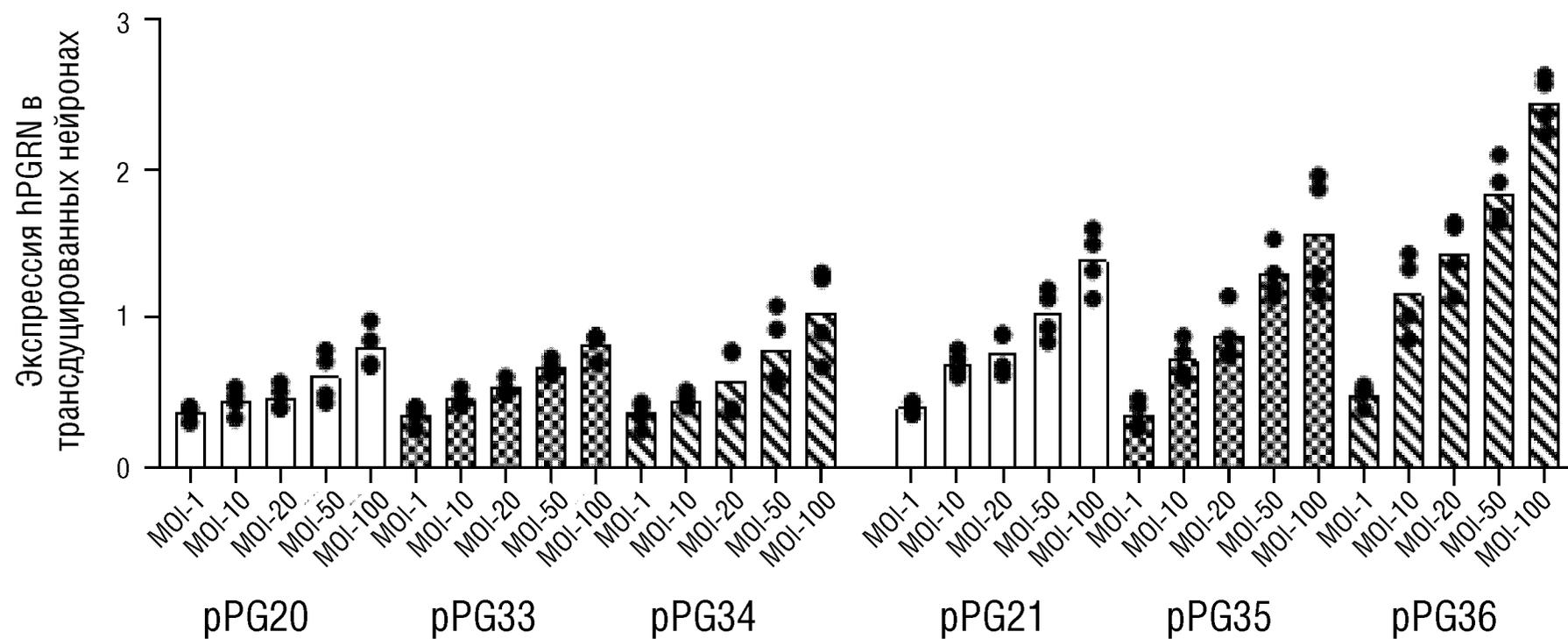
B



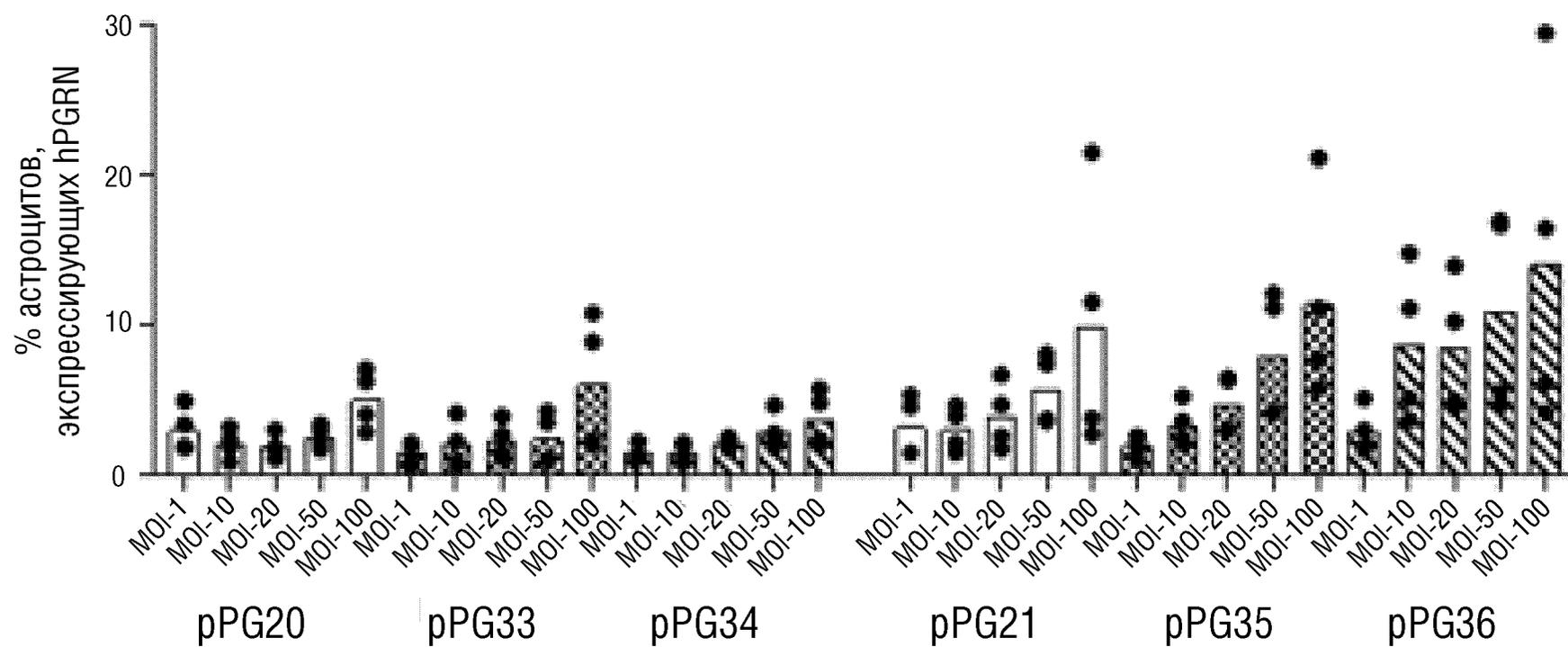
ФИГ.3А



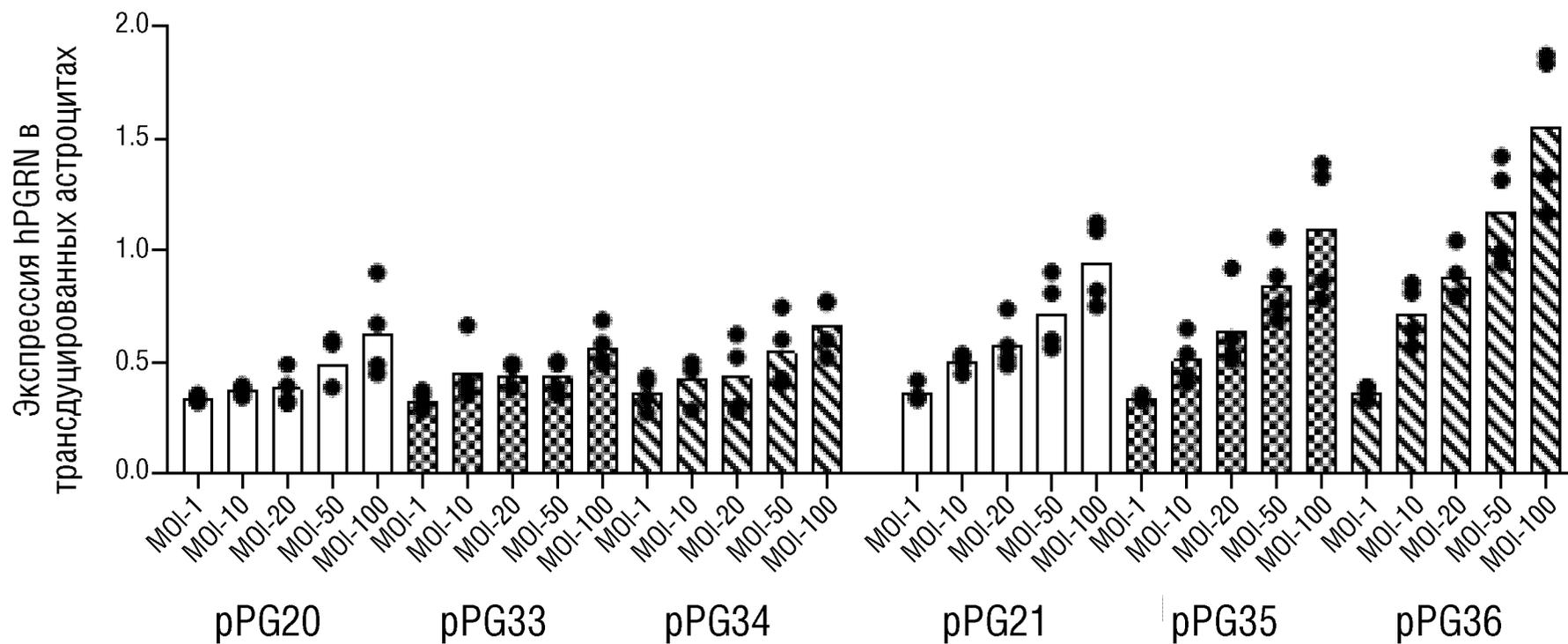
ФИГ.3В



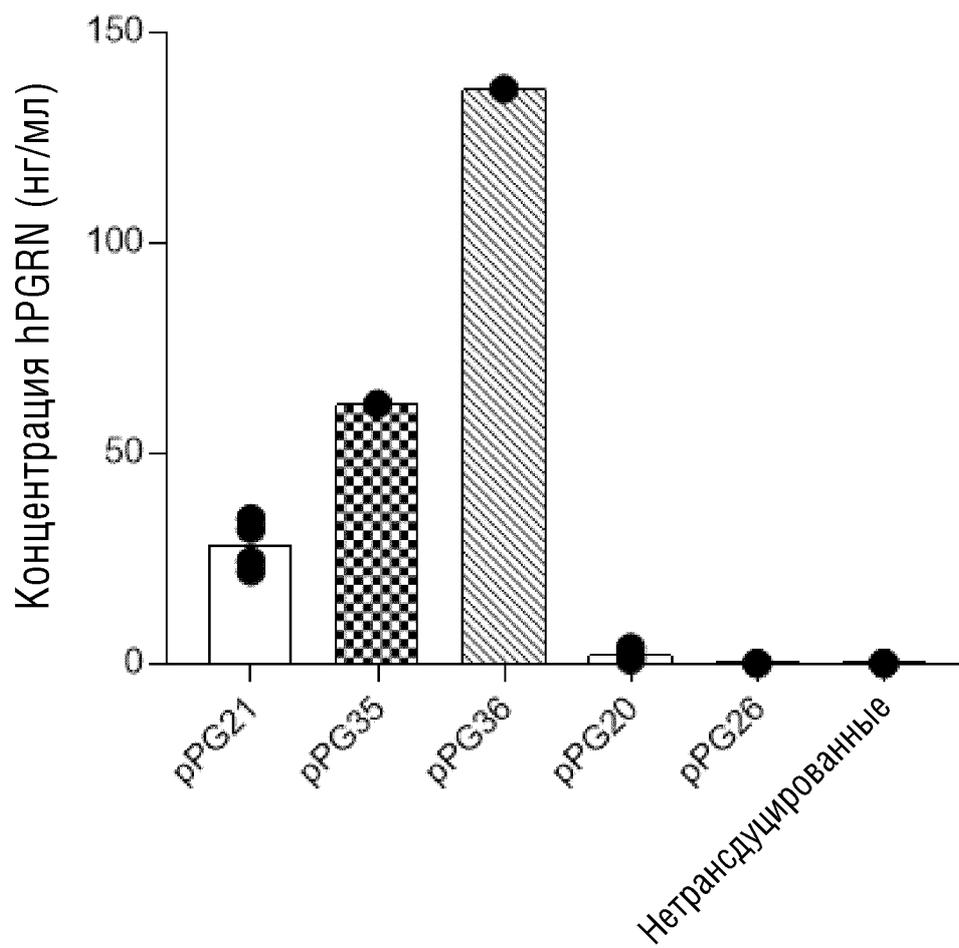
ФИГ.3С



ФИГ.3D

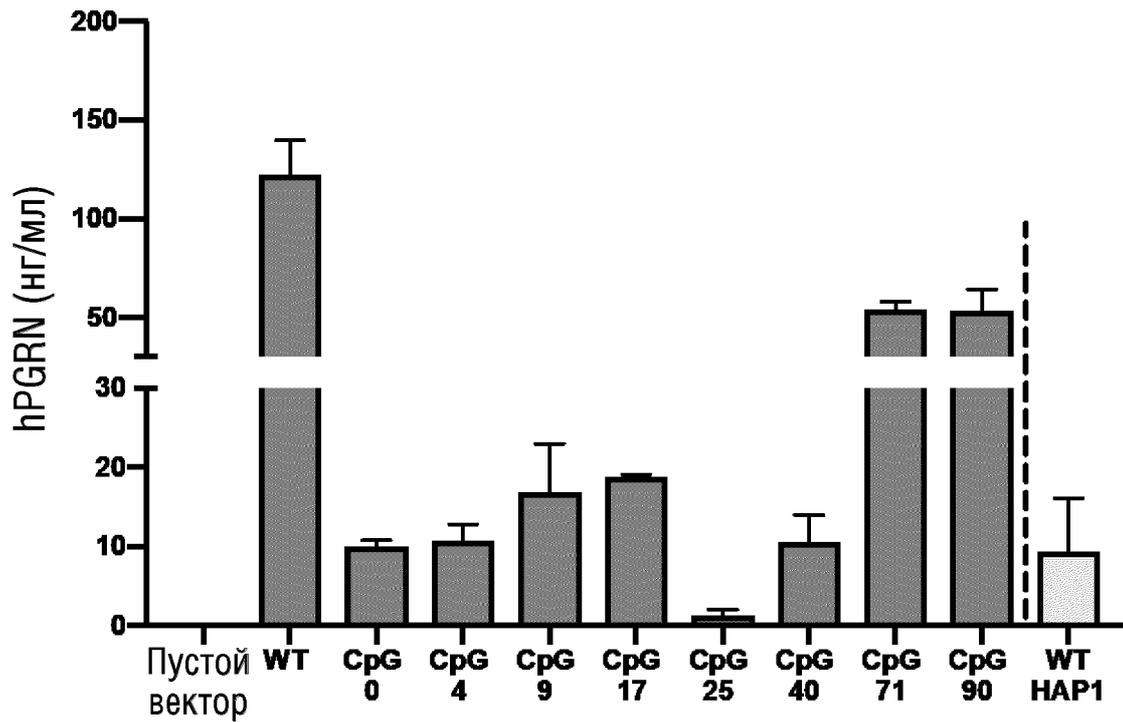


ФИГ.4

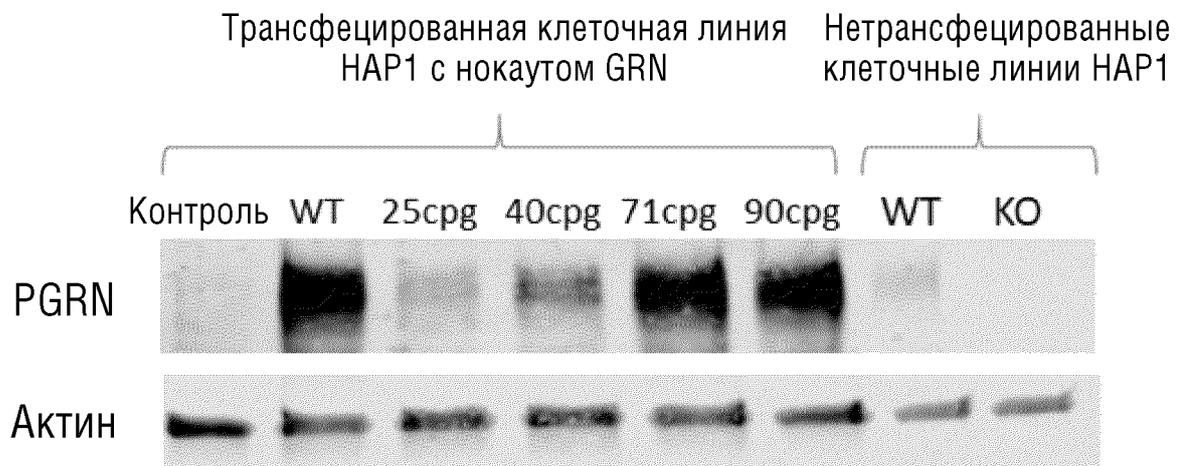


ФИГ.5

А

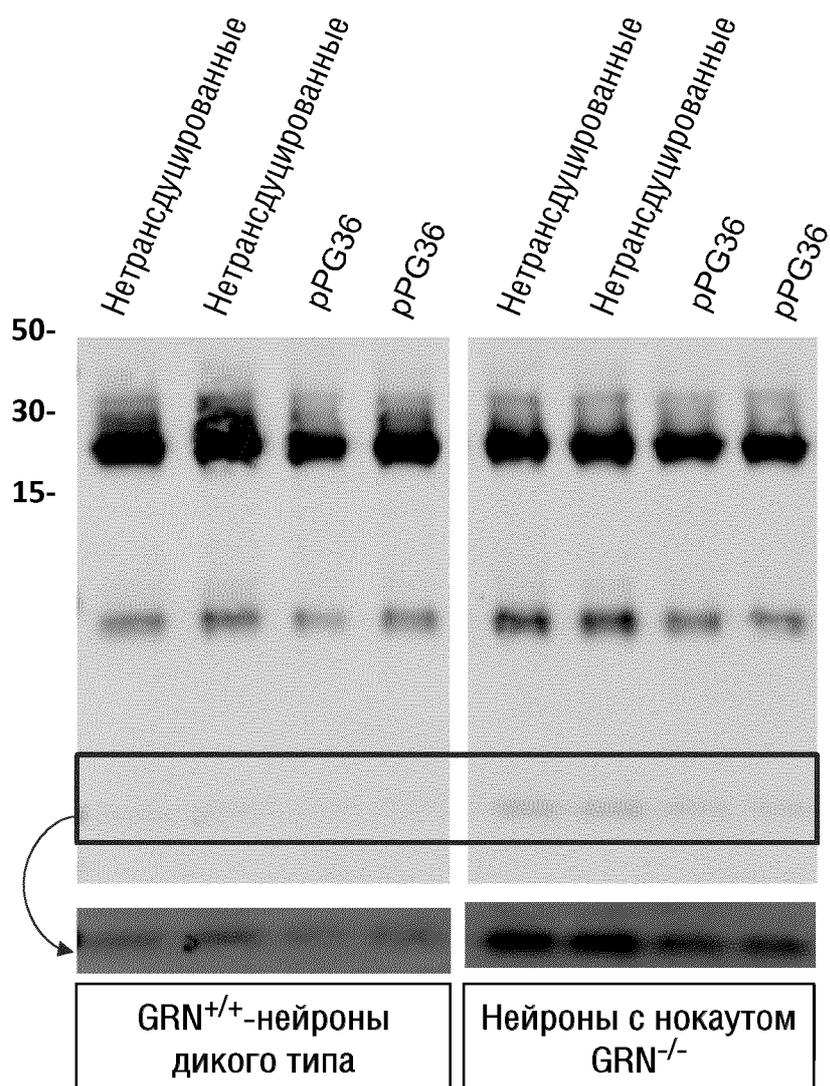


В



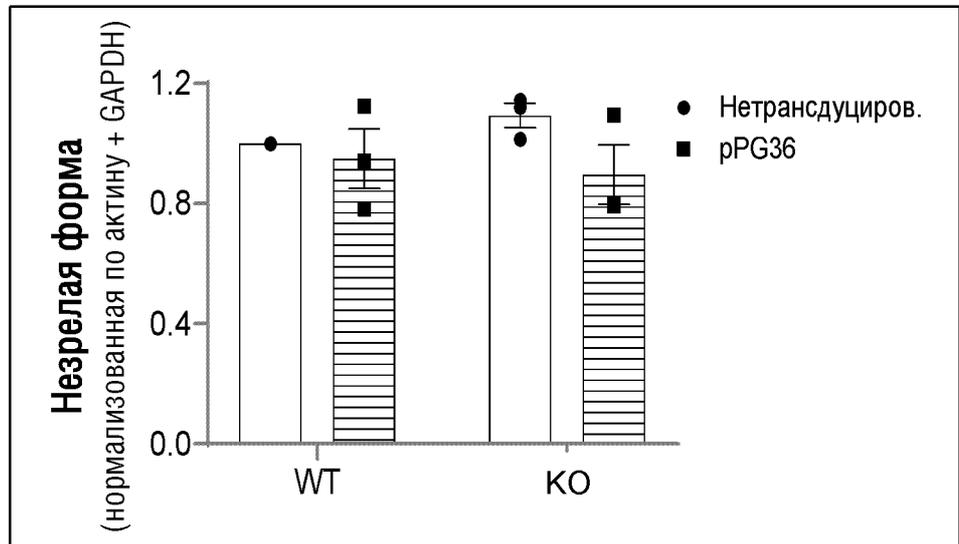
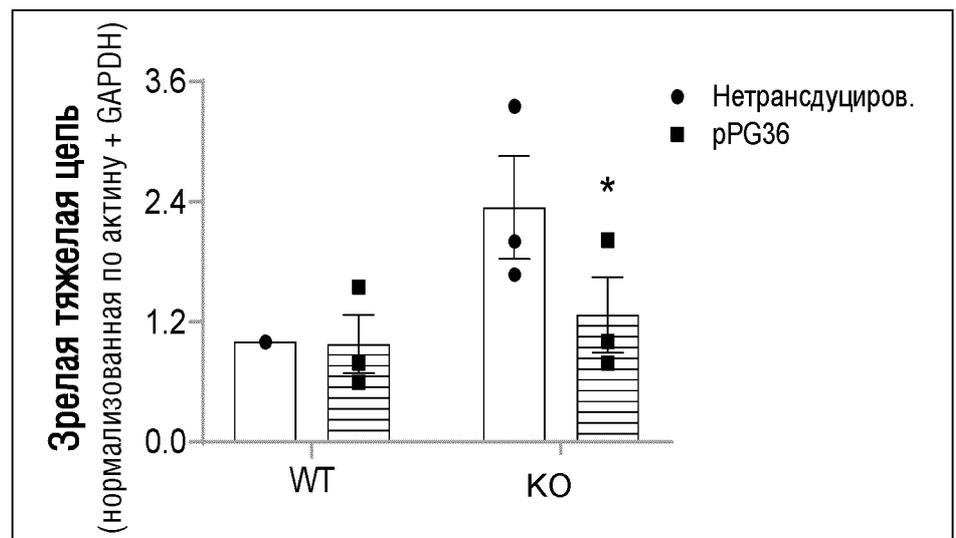
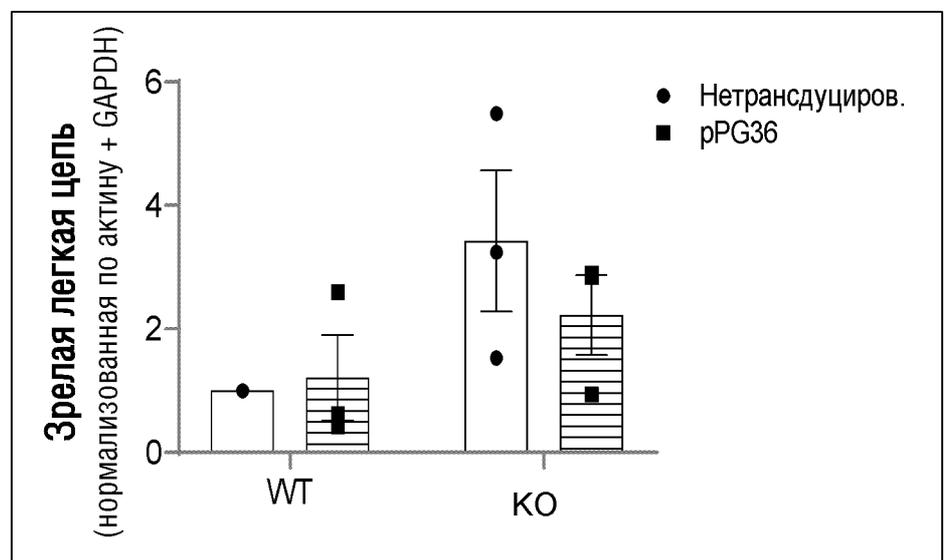
ФИГ.6

А



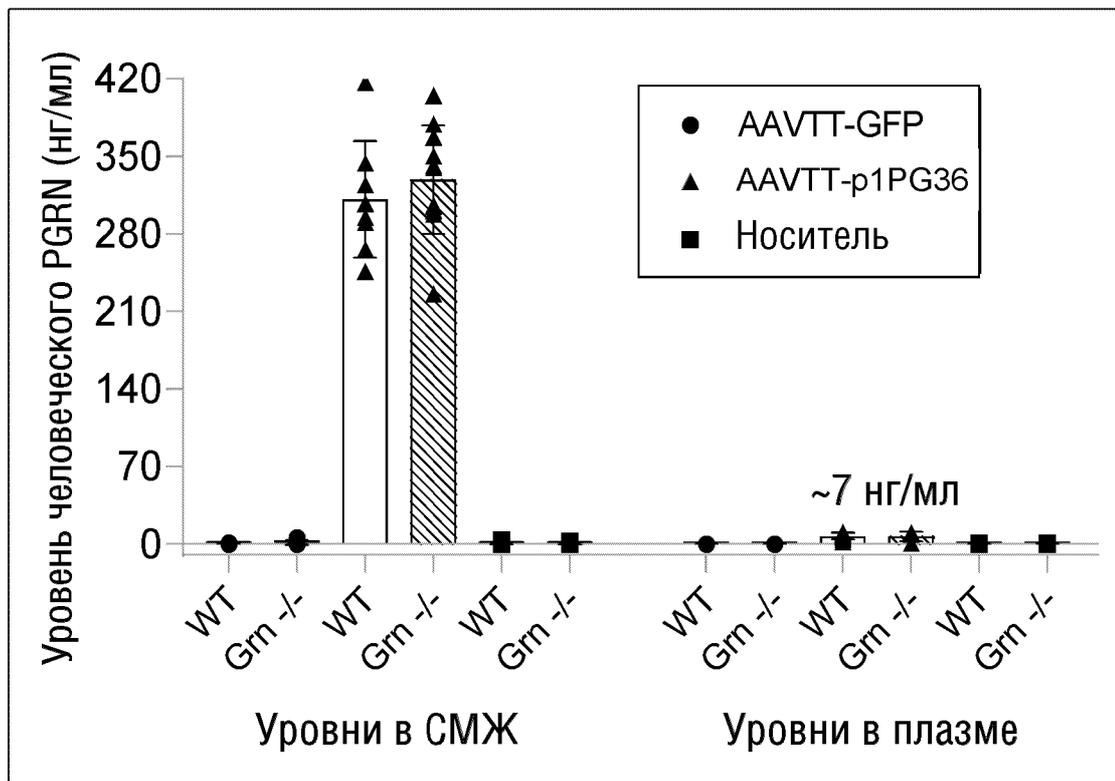
ФИГ.6 (продолжение)

В

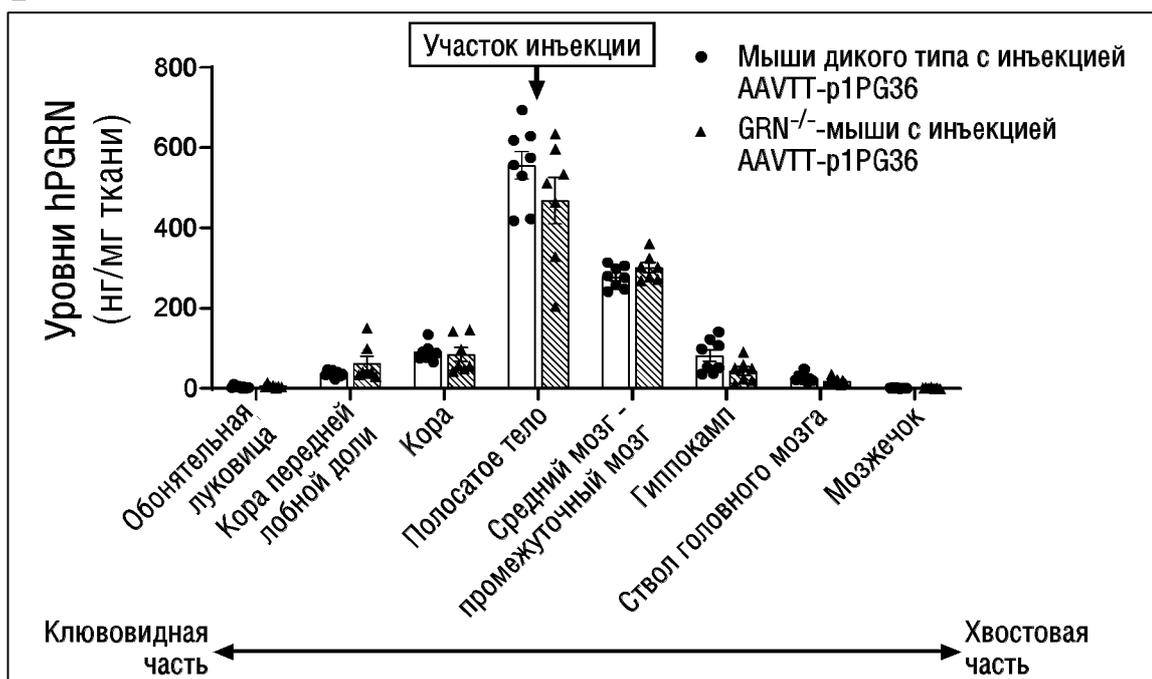
Незрелые*Зрелая
тяжелая цепь**Зрелая легкая
цепь*

ФИГ.7

А

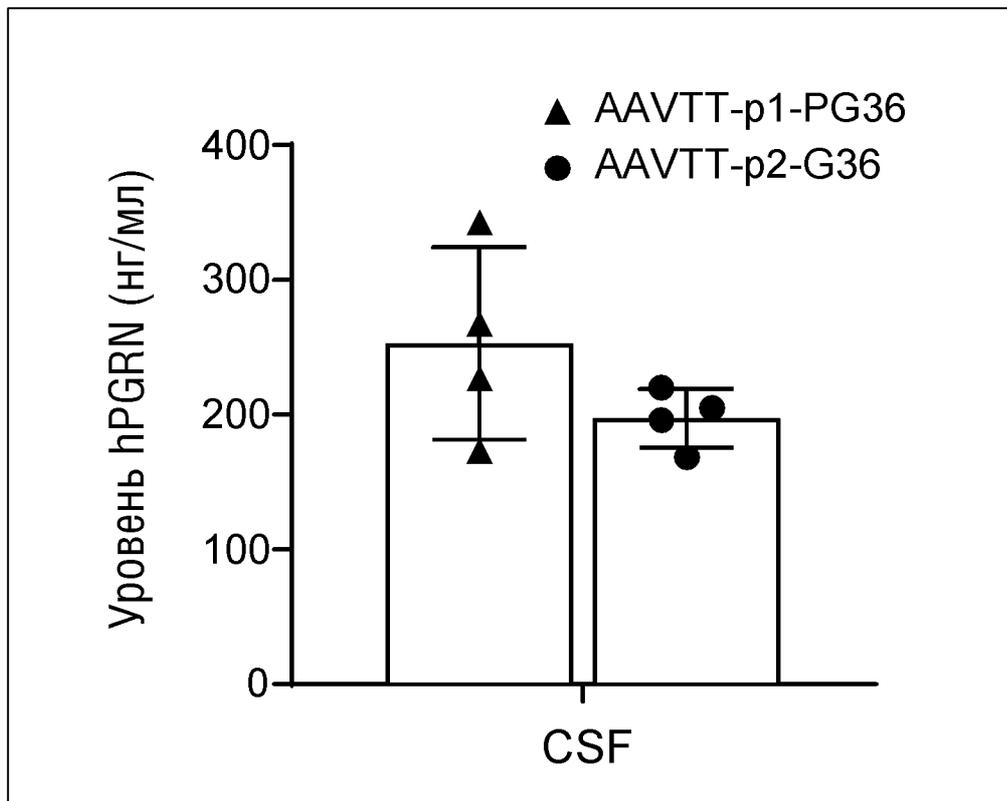


В



ФИГ.7

с

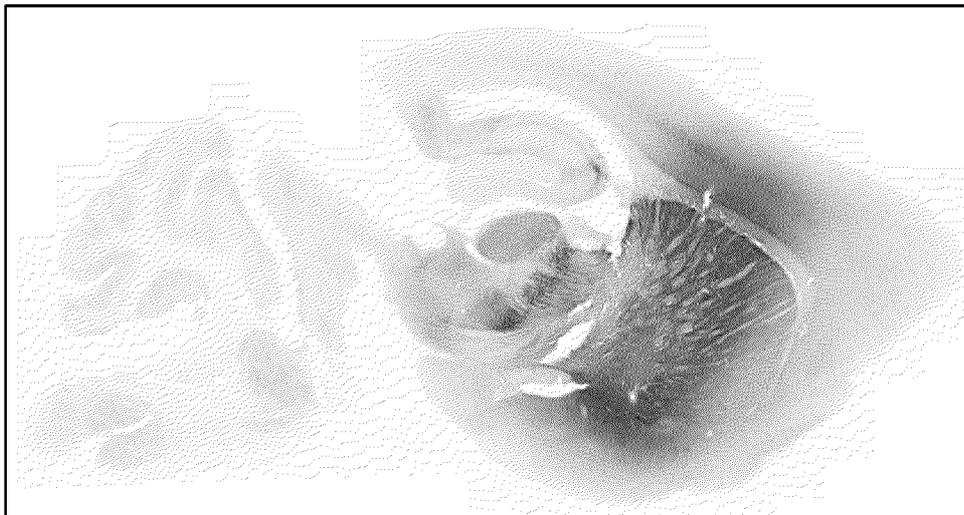


ФИГ.8

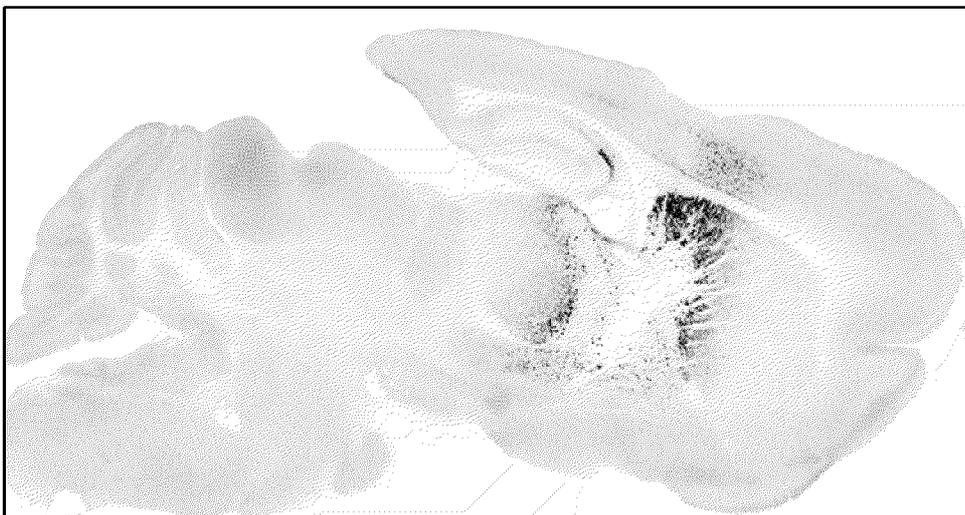
Носитель: ИГХ-окрашивание на hPGRN



AAVTT-pPG36: ИГХ-окрашивание на hPGRN

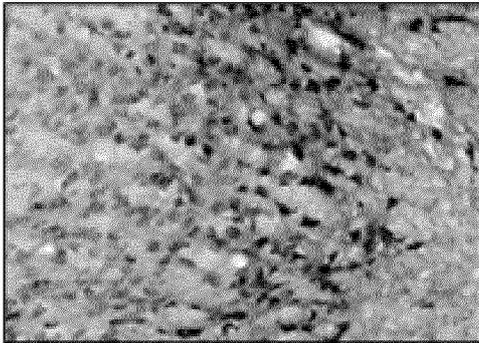


AAV-nlsGFP: GFP-сигнал



ФИГ.8 (продолжение)

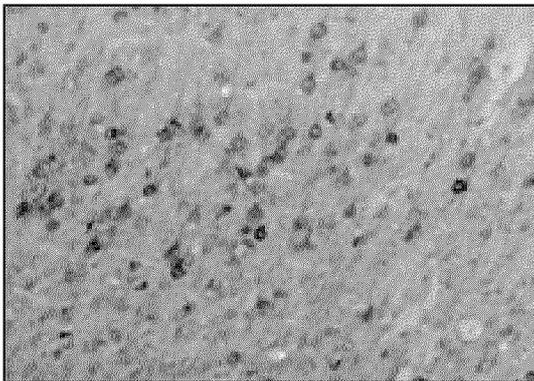
Таламус



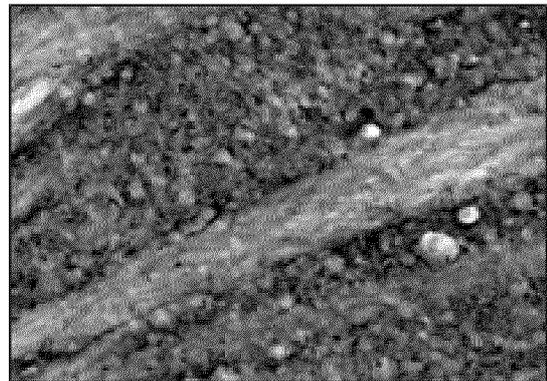
Гиппокамп



Кора

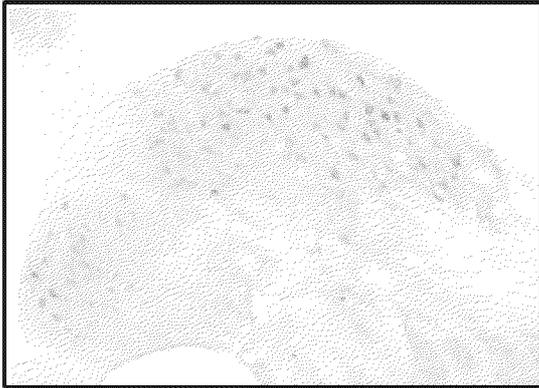


Полосатое тело

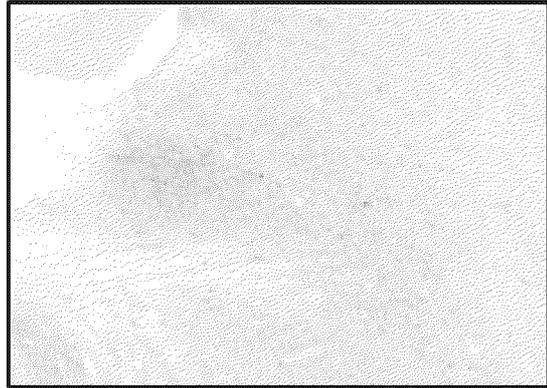


ФИГ.8 (продолжение)

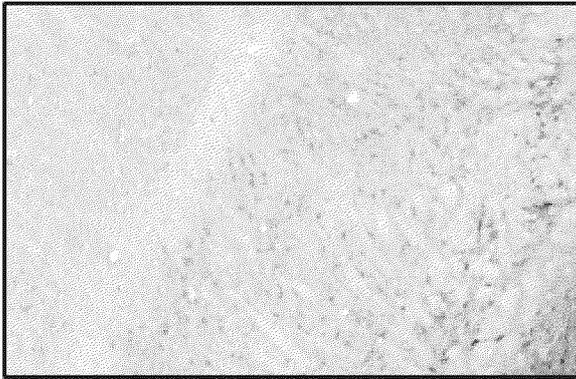
Ядро мозжечка



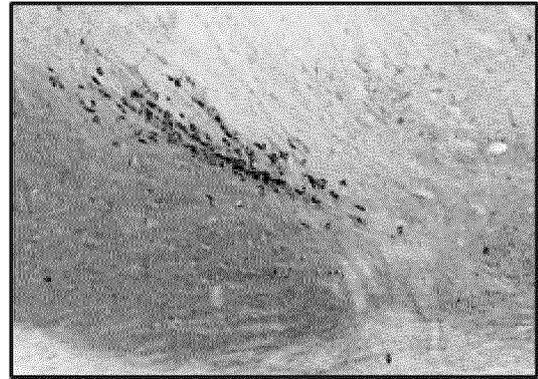
Ядро околоплечевой области



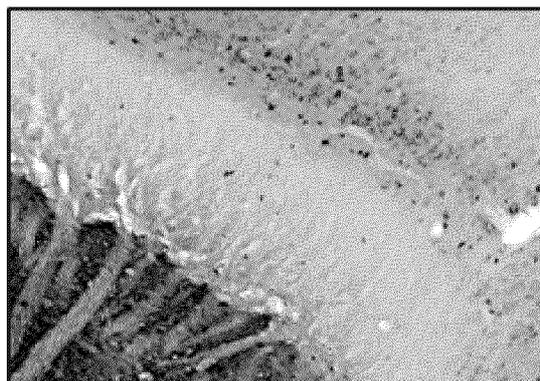
Средний мозг



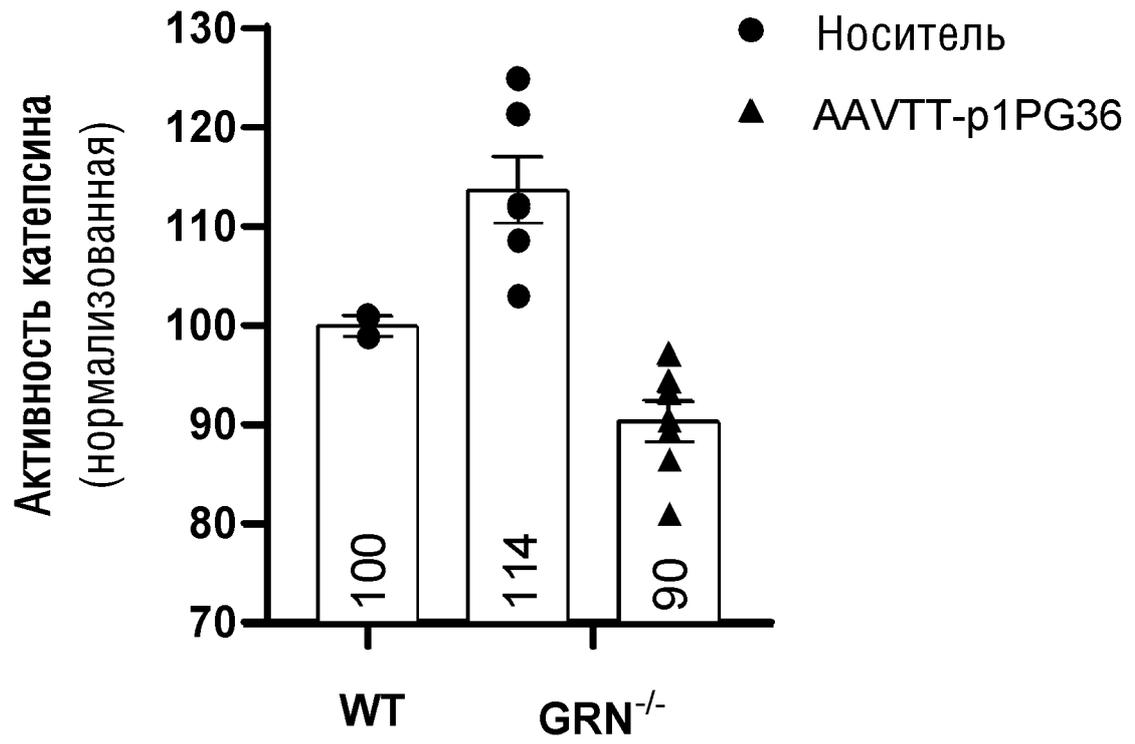
Черное вещество



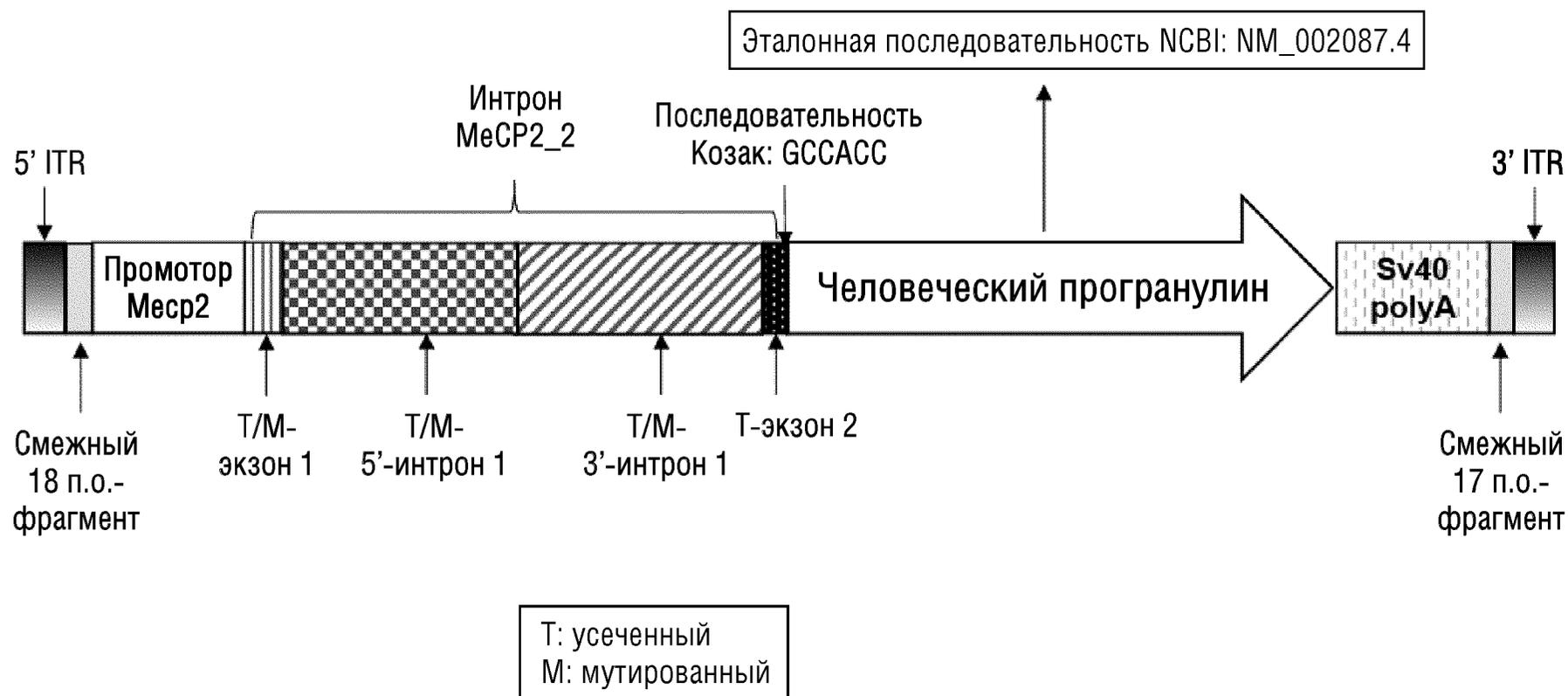
Мозолистое тело



ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11

