

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390615** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.24

(22) Дата подачи заявки  
2021.09.30

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
AIMP2-DX2 И НЕОБЯЗАТЕЛЬНО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ-МИШЕНИ miR-142 И ИХ  
КОМПОЗИЦИЙ**

---

(31) 63/085,950

(32) 2020.09.30

(33) US

(86) PCT/IB2021/059017

(87) WO 2022/070141 2022.04.07

(71) Заявитель:

ДЖЕНЕРОАТ КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:

Чхой Джин Ву, Пэк Кёнхва (KR)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

---

(57) В изобретении описаны способы лечения нейрональных заболеваний, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту вектора, содержащего AIMP2-DX2 и необязательно последовательность-мишень miR-142.

**202390615**  
**A1**

**202390615**

**A1**

## СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ AIMP2-DX2 И НЕОБЯЗАТЕЛЬНО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ-МИШЕНИ miR-142 И ИХ КОМПОЗИЦИЙ

### ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании даты подачи заявки на патент США № 63/085,950, поданной 30 сентября 2020 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

**[0002]** Содержание поданного в электронном виде перечня последовательностей в формате текстового файла ASCII (название: 2493-0004WO01\_Sequence Listing\_ST25.txt; размер: 28 кб; и дата создания: 30 сентября 2021), поданного вместе с настоящей заявкой, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** В настоящей заявке описаны способы лечения нейрональных заболеваний, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту вектора, содержащего AIMP2-DX2 и необязательно последовательность-мишень miR-142.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0004]** Головной мозг млекопитающих может выполнять сложные функции путем создания системной нейронной сети после прохождения ряда процессов, включая деление, дифференцировку, выживаемость и гибель нейрональных стволовых клеток, образование синапсов и т.д. Нейроны в головном мозге животных непрерывно производят широкий спектр веществ, необходимых для роста нервов даже в их зрелом состоянии, тем самым вызывая рост аксона и дендрита. Более того, можно сказать, что они непрерывно дифференцируются, поскольку происходит непрекращающееся синаптическое ремоделирование нейронной сети и синаптических связей всякий раз, когда происходит новое обучение и запоминание. Нейроны подвергаются апоптозу, если они неспособны получить происходящие из мишеней факторы выживания, такие как фактор роста нервов, в процессе дифференцировки клеток и формирования синапса, и апоптозу вследствие стресса, и цитотоксические агенты становятся основной причиной дегенеративных расстройств головного мозга. Когда периферическая нервная система

животных, в отличие от центральной нервной системы, повреждена, аксоны регенерируют в течение длительного периода времени. Аксоны в задней части поврежденных нервов дегенерируют в процессе, известном как валлерова дегенерация, и тело нервной клетки возобновляет рост аксонов, в то время как шванновские клетки регенерируют после прохождения процесса регенерации, включая детерминацию нерва-мишени путем выживания и отмирания после деления перед прохождением дифференцировки, и т. д.

**[0005]** Во всем мире наблюдается тенденция к постоянному увеличению проявлений нейродегенеративных заболеваний с каждым годом наряду с быстрым увеличением численности пожилого населения. Поскольку оптимальные методы профилактики и лечения еще не открыты, до сих пор нет лекарственного средства с выдающейся эффективностью в лечении таких заболеваний. Кроме того, существующие лекарственные и терапевтические средства, применяемые для лечения этих расстройств, часто демонстрируют побочные эффекты и токсичность, возникающие при длительном приеме. Более того, поскольку их действие состоит только во временном уменьшении степени симптомов или задержке прогрессирования симптомов, а не в излечении заболеваний, необходимо срочно найти и разработать материалы с бесспорными эффектами лечения при одновременном снижении побочных эффектов и токсичности.

**[0006]** Было проведено около 600 клинических испытаний генной терапии на людях, которые продолжались до 2002 года с момента начала клинических испытаний в 1990 году. Основываясь на завершеном анализе последовательности генома человека в 2003 году, разработка новых методов генной терапии ускорится в будущем за счет исследования диапазона разнообразных генов. Тем не менее, 75% генных терапий, которые были одобрены до настоящего времени, нацелены на моногенные заболевания, такие как рак или муковисцидоз, и т.д., и отсутствует активная разработка препаратов генной терапии для нейронных расстройств или регенерации (справочный документ Recombinant DNA Национального института здравоохранения (NIH) США (2002); Gene Therapy Clinical Trials, J. Gene Med. (2002), [www.wiley.co.uk/genmed](http://www.wiley.co.uk/genmed)). Тем не менее, уже были попытки разработки генной терапии с применением фактора роста нервов, такого как NT-3, и глиального нейротрофического фактора (GDNF) для лечения и регенерации сенсорных нейронов при болезни Паркинсона (GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons (Mol. Cell. Neurosci. 25:4453-4459 (2004)). Поскольку наблюдается медленный прогресс во всех нейробиологических исследованиях функций головного мозга в отношении расстройств нервной системы,

разработка лекарственных средств для лечения различных хронических расстройств нервной системы также сталкивается с трудностями.

**[0007]** AIMP2-DX2 является альтернативным, антагонистическим сплайс-вариантом AIMP2, который представляет собой мультифакториальный апоптотический ген. Известно, что AIMP2-DX2 подавляет апоптоз клеток, препятствуя функциям AIMP2. AIMP2-DX2, действуя как конкурентный ингибитор AIMP2, подавляет опосредованный TNF-альфа апоптоз посредством ингибирования убиквитинирования/деградации TRAF2. Кроме того, сообщали о подтверждении того, что AIMP2-DX2 является индуцирующим фактором существующего рака легких, и в существующих исследованиях подтвердили, что AIMP2-DX2, обнаруживаемый в больших количествах в раковых клетках, индуцирует рак, препятствуя подавляющим раку функциям AIMP2. Более того, обнаружили, что проявление AIMP2-DX2 в нормальной клетке вызывает прогрессирование злокачественного перерождения клеток, тогда как подавление проявления AIMP2-DX2 подавляет рост рака, тем самым демонстрируя эффекты лечения.

**[0008]** Также определили, что AIMP2-DX2 может быть пригоден для лечения нейрональных заболеваний (KR10-2015-0140723 (2017) и US2019/0298858 (публ. 23 октября 2019 г.)

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0009]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы отсрочивания начала заболевания у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0010]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования гибели нервных клеток у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0011]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения мышечной атрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2). В некоторых вариантах реализации у субъекта присутствует боковой амиотрофический склероз (БАС). В некоторых вариантах реализации у субъекта присутствует спинальная мышечная атрофия (СМА).

**[0012]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы повышения уровня выживаемости или увеличения продолжительности жизни субъекта с болезнью Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0013]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы предотвращения расстройства поведения, восстановления двигательного симптома и/или уменьшения нейронального повреждения у субъекта с болезнью Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0014]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования вызванной олигомером бета-амилоида (A $\beta$ -O) гибели нервных клеток или вызванной A $\beta$ -O экспрессии p53 у субъекта с болезнью Альцгеймера (БА), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0015]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС) у субъекта со спинальной мышечной атрофией (СМА), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0016]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС), ингибирования вызванной блокированием НМС дыхательной недостаточности, затруднения дыхания, ингибирования вызванной блокированием НМС мышечной судороги или фасцикуляции у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0017]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы подавления аноксиса и/или повышения стабилизации рецептора ламинина у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), болезнью Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0018]** Указанный рекомбинантный вектор может дополнительно содержать последовательность-мишень miR-142.

**[0019]** Вектор может дополнительно содержать промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2. В некоторых вариантах реализации указанный промотор представляет

собой промотор ретровируса (LTR), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор EF-1-альфа, промотор UB6, промотор бета-актина курицы, промотор CAG, промотор RPE65 или промотор опсина.

**[0020]** Последовательность-мишень miR-142 может находиться с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2.

**[0021]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

**[0022]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

**[0023]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 10 или 11.

**[0024]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или 11.

**[0025]** Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСАСТА. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 содержит АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA). В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5.

**[0026]** В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 содержит АСТТТА. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 содержит АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG). В некоторых вариантах реализации

последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7.

[0027] Последовательность-мишень miR-142 может повторяться 2 - 10 раз в векторе, описанном в настоящей заявке.

[0028] Указанный вектор может представлять собой вирусный вектор. Вирусный вектор может представлять собой вектор на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса лейкоза мышей (MLV), вируса саркомы/лейкоза птиц (ASLV), вируса некроза селезенки (SNV), вируса саркомы Рауса (RSV), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вируса простого герпеса или вируса коровьей оспы.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0029] На ФИГ. 1 представлен пример рекомбинантного вектора.

[0030] На ФИГ. 2 показан эффект специфической для нервных клеток экспрессии рекомбинантного вектора в условиях *in vitro*.

[0031] На ФИГ. 3 показана специфическая для головного мозга экспрессия после интрапаренхиматозной инъекции (в черное вещество) scAAV-DX2-miR142-3pT в модели болезни Паркинсона.

[0032] На ФИГ. 4 показана последовательность miR142-3pT (мишени) (SEQ ID NO: 6) с 4 повторами miR142-3pT (подчеркнуты).

[0033] На ФИГ. 5А показано схематическое изображение miR142-3pT с 1х, 2х, и 3х повторами и мутантной последовательности. На ФИГ. 5В показано ингибирование посредством miR142-3p экспрессии DX2 с 1х, 2х и 3х повторами miR-142-3pT.

[0034] На ФИГ. 6 показано, что коровая последовательность для связывания важна для ингибирования DX2. Вектор с х3 повторами Tseq, у которого выявили значительное ингибирование DX2 (ФИГ. 5В), и конструкцию DX2 использовали в качестве контролей. Введение 100 пмоль miR-142-3p значительно ингибировало вектор Tseq х3, но DX2 и мутантная последовательность не ингибировались.

[0035] На ФИГ. 7 показана общая РНК, выделенная из спинного мозга модели БАС после интратекальной инъекции scAAV2-DX2-miR142-3p. Проводили кРВ-ПЦР.

[0036] На ФИГ. 8 показан эффект специфической для нервных клеток экспрессии вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением в условиях *in vitro*.

[0037] ФИГ. 9А - 9Е. У трансгенных по DX2 мышей, которым вводили ротенон, восстанавливались двигательные симптомы. ФИГ. 9А. Анализировали экспрессию TH в

головном мозге указанных мышей. Черный пунктирный четырехугольник показывает TF-окрашенные области. ФИГ. 9В. Тест на вращающемся стержне (Rotarod). Продолжительность периода до падения у получивших ротенон мышей дикого типа и трансгенных (TG) по DX2 мышей. ФИГ. 9С. Тест на шесте (Pole test). Вертикальное перемещение (левая панель) и время разворота (правая панель) у получивших ротенон мышей дикого типа и TG по DX2 мышей. Животные:  $n = 6$  (в каждой группе),  $n/z$ : незначимо,  $**P < 0,01$ ,  $*P < 0,05$ , t-критерий. ФИГ. 9D и 9E. DX2 улучшает нейрональное повреждение и поведение в модели вызванной ротеноном БП у мышей. ФИГ. 9D. Тест на шесте. scAAV-DX2 восстановил координацию движений и равновесие в модели вызванной введением ротенона БП у мышей. «Контр» и «GFP» обозначают мышей дикого типа и получивших ротенон мышей, которым ввели инъекцию GFP. «Доза 1» и «Доза 2» представляют собой различные дозы инъекции DX2 мышам, получившим ротенон. ФИГ. 9E. Изображения иммуногистохимии и иммунофлуоресценции черного вещества мыши. На верхней панели показаны TH-положительные клетки в стриатуме, а на нижней панели представлено распределение введенного путем инъекции экспрессирующего GFP вируса. Черный пунктирный четырехугольник указывает на окрашенную область TH. Животные:  $n = 5$  (в каждой группе),  $n/z$ : незначимо,  $**P < 0,05$ ,  $*P < 0,01$ , t-критерий.

**[0038]** ФИГ. 10А - 10Н. DX2 предотвращает расстройство поведения в модели вызванной 6-ГДА БП. ФИГ. 10А. У мыши, которой вводили scAAV-DX2, выявили более низкие уровни контрлатерального вращения по сравнению с таковыми у мышей, получивших физиологический раствор или носитель (GFP), что свидетельствует о том, что DX2 уменьшал повреждение дофаминергических нейронов. ФИГ. 10В. У мышей, которым вводили DX2, выявили увеличение количества касаний противоположной передней лапой, что свидетельствует о том, что AAV-DX2 уменьшал одностороннее повреждение дофаминергических нейронов. ФИГ. 10С. У мыши, которой вводили AAV-DX2, выявили меньшее доминирование правосторонних поворотов тела. Животные: физиологический раствор (мыши дикого типа, которым вводили физиологический раствор)  $n = 4$ , GFP (мыши, которым инъецировали GFP и вводили 6-ГДА)  $n = 5$ , DX2 (мыши, которым инъецировали DX2 и вводили 6-ГДА)  $n = 11$  (каждая мышь), scAAV: scAAV-GFP  $4 \times 10^9$  геномов вектора (гв), scAAV-DX2 низкий  $1,6 \times 10^8$  гв, scAAV-DX2  $4 \times 10^9$  гв,  $n/z$ : незначимо,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,005$ ,  $***P < 0,001$ , t-критерий. ФИГ. 10D. Иммунофлуоресцентное изображение головного мозга мышей, в который вводили путем инъекции GFP и DX2. Белый четырехугольник указывает на TH-положительные



дофаминергические нервные клетки, а белые стрелки указывают на место инъекции вируса. ФИГ. 10Е. Уровень выживаемости в каждой группе мышей. Животные: n = 15, «Физиологический раствор» обозначает мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор. «L-ДОФА», «GFP» и «DX2» обозначают инъекцию L-ДОФА, GFP и DX2 мышам, которым вводили 6-ГДА. scAAV: scAAV-GFP (GFP)  $4 \times 10^9$  гв, scAAV-DX2 (DX2) (низкий)  $1,6 \times 10^8$  гв, scAAV-DX2 (DX2) (высокий)  $4 \times 10^9$  гв. ФИГ. 10F и 10G. Экспрессия мРНК DX2 и Вах у исходных мышей и мышей, которым вводили 6-ГДА и DX2.  $***P < 0,001$ , t-критерий. ФИГ. 10H. Гибридизация РНК *in situ* для идентификации экспрессирующих DX2 клеток в созданной с помощью 6-ГДА модели на мышцах, которым вводили путем инъекции AAV-DX2.

**[0039]** ФИГ. 11А - 11G. DX2 снимает двигательные симптомы в модели вызванной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) БП. ФИГ. 11А. У мыши, которой вводили scAAV-DX2, выявили немного большую продолжительность периода до падения в тесте на вращающемся стержне по сравнению с таковой, которой вводили носитель (scAAV-GFP, GFP), что свидетельствует о том, что scAAV-DX2 уменьшал повреждение дофаминергических нейронов. ФИГ. 11В. У мыши, которой вводили DX2, выявили улучшенную локомоторную активность на основании протокола SHIRPA. ФИГ. 11С. У мышей, которым вводили DX2, выявили относительно более низкий уровень нарушения со стороны конечностей. ФИГ. 11D. У мыши со сверхэкспрессией DX2 выявили улучшенный уровень груминга по сравнению с контрольной, которой вводили носитель (GFP). ФИГ. 11Е. Иммунофлуоресцентное изображение TH-положительных клеток в черном веществе мышей. Белый четырехугольник указывает на экспрессирующие TH области. ФИГ. 11F и 11G. Экспрессия мРНК DX2 (ФИГ. 11F) и Вах (ФИГ. 11G) в головном мозге указанных мышей. «Исходные», «GFP» и «DX2» обозначают мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор, мышей, которым инъецировали GFP и вводили МФТП, и мышей, которым инъецировали DX2 и вводили МФТП. Животные: исходные n = 6, GFP n = 9, DX2 n = 12, scAAV: scAAV-GFP  $4 \times 10^9$  гв, scAAV-DX2  $4 \times 10^9$  гв,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,001$ ,  $***P < 0,0001$ , t-критерий.

**[0040]** ФИГ. 12А и 12В. Введение DX2 отсрочивает начало заболевания (ФИГ. 12А) и увеличивает продолжительность жизни (ФИГ. 12В) в модели болезни Лу Герига. Животные: n = 5.

**[0041]** На ФИГ. 13 представлена морфология клеток при светлопольной микроскопии. Сверхэкспрессия DX2 в инфицированных AAV-DX2 клетках ингибирует опосредованную Аβ-О гибель клеток. DX2 повышает жизнеспособность клеток среди

обработанных Аβ-О клеток. Клетки SK-SY5Y инкубировали с AAV-DX2 или AAV-GFP в отсутствие или в присутствии 25 мкМ Аβ-О, через 48 часов наблюдали гибель клеток с помощью микроскопии. Изображения с исходным увеличением: X40 (верхняя панель), X100 (нижняя панель).

**[0042]** На ФИГ. 14 показан количественный анализ гибели клеток с ФИГ. 13. Белый прямоугольник показывает процент гибели клеток, а черный прямоугольник показывает процент жизнеспособности клеток.

**[0043]** На ФИГ. 15 показан уровень экспрессии p53. Экспрессия DX2 играет важную роль в вызванной нейротоксином экспрессии p53. \*AAV-DX2 (#1) и AAV-DX2 (#2) указывают на различные партии продуцированного вируса AAV-DX2.

**[0044]** ФИГ. 16A - 16D. Мутантный SOD1 избирательно взаимодействует с KARS1. ФИГ. 16A. Аффинность связывания Lex-KARS1 с B42-SOD1 дикого типа (ДТ) и мутантами G85R и G93A исследовали с помощью дрожжевого двугибридного анализа. ФИГ. 16B. Клетки НЕК 293 трансфицировали HA-SOD1 ДТ, G85R и G93A и проводили иммунопреципитацию (ИП) с помощью антитела против HA. Уровни KARS1 и SOD1 определяли путем иммуноблоттинга. ФИГ. 16C. Аффинность связывания фрагментов KARS1 с мутантами SOD1 определяли с помощью дрожжевого двугибридного анализа. ФИГ. 16D. Клетки N2A трансфицировали мус-KARS1 и SOD1 ДТ, G93A, G85RA. Проводили ИП мус-KARS1 и иммуноблоттинг для детектирования AIMP2 и 67LR (рецептор ламинина).

**[0045]** На ФИГ. 17A - 17F. Мутантный SOD1 снижал вызванный 67 кДа рецептором ламинина аноиксис. ФИГ. 17A. Клетки SK-N-SH трансфицировали SOD1 ДТ и G93A. Собирали клетки и проводили иммуноблоттинг против 67 кДа рецептора ламинина (LR). ФИГ. 17B. Нервные клетки трансфицировали SOD1 ДТ и G93A, а затем высевали на покровное стекло 22x22. Клетки фиксировали, а затем обрабатывали антителом против KARS1 или 67LR, после чего получали изображения с помощью конфокальной микроскопии. Белая стрелка указывает на окрашенный рецептор ламинина. ФИГ. 17C. Для того чтобы увидеть эффект трансфекции SOD1 ДТ и G93A на миграцию, нервные клетки загружали в верхнюю камеру, а ДТ и G93A загружали в нижнюю камеру планшета Transwell, где камеры разделены мембраной с размером пор 8,0 мкм. Мембрану вырезали и окрашивали. ФИГ. 17D. Нервные клетки трансфицировали SOD1 ДТ или G93A, затем обрабатывали ламинином 1 (LN1) в течение 0, 15, 30 и 60 мин. Уровни pERK и ERK проверяли с помощью вестерн-блоттинга. ФИГ. 17E. Аффинность связывания KARS1 с 67 LR в клетках, экспрессирующих SOD1 ДТ и мутантный SOD1,

определенная с помощью иммунопреципитации. ФИГ. 17F. Клетки SH-SY5Y высевали, трансфицировали KARS1 в течение 24 ч, а затем SOD1 ДТ, G85R и G93A в течение 24 ч. Затем их высевали на покрытые 2-гидроксиэтилметакрилатом (HEMA) предметные стекла, потом обрабатывали TNF- $\alpha$  и циклогексимидом (CHX) в течение 6 ч. Проводили анализ МТТ для определения жизнеспособности клеток.

**[0046]** ФИГ. 18A - 18D. Влияние гена AIMP2-DX2 на KARS1 и 67LR. ФИГ. 18A. Клетки SK-N-SH трансфицировали SOD1 ДТ или G93A, затем обрабатывали KARS1 с DX2 или AIMP2. Собирали клетки и проводили вестерн-блоттинг. ФИГ. 18B. Клетки нейробластомы трансфицировали Strep-DX2 в течение 24 ч, а затем SOD1 ДТ, G93A и G85R в течение 24 ч. Клетки собирали и проводили субклеточное фракционирование, и проводили иммуноблоттинг образцов. ФИГ. 18C. Нервные клетки трансфицировали SOD1 ДТ или G93A, а затем их обрабатывали AAV-ПВ или AAV-DX2. Клетки обрабатывали ламинином 1 (LN1) в течение 0, 15, 30 и 60 мин. Клетки лизировали, а затем проводили иммуноблоттинг для выявления уровней p-ERK и ERK. ФИГ. 18D. Клетки SH-SY5Y трансфицировали SOD1 ДТ или G93A, а затем обрабатывали TNF- $\alpha$  (30 нг/мл) в течение 24 ч. Прикрепление клеток измеряли с помощью iCelligence.

**[0047]** ФИГ. 19A - 19B. Введение DX2 спасает вызванную мутантным SOD1 гибель нейронов. ФИГ. 19A. Клетки SH-SY5Y трансфицировали SOD1 ДТ, G85R и G93A и обрабатывали TNF- $\alpha$  и циклогексимидом (CHX) в течение 6 ч, а затем контрольным вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (GFP) или DX2. Жизнеспособность клеток проверяли с помощью анализа МТТ. ФИГ. 19B. Первичные нервные клетки выделяли из каждой мыши, высевали на 24-луночный планшет, обрабатывали AAV-GFP или AAV-DX2 и проводили анализ МТТ, чтобы проверить их жизнеспособность.

**[0048]** ФИГ. 20A. Анализ связывания показал, что DX2 связывается с PARP-1 сильнее, чем AIMP2. ФИГ. 20B. В трансфицированных AIMP2 клетках выявили значительно большее расщепление PARP-1 по сравнению с экспрессией, наблюдаемой в других трансфицированных клетках, в условиях окислительного стресса. Тем не менее, расщепление PARP-1 не наблюдали в трансфицированных DX2 клетках. ФИГ. 20C. ПАРилирование AIMP2 повышалось в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, но ПАРилирование DX2 не изменялось.

**[0049]** ФИГ. 21A - 21C. Сравнение последовательностей аминокислот AIMP2-DX2 и вариантов (ФИГ. 21B и 21C представляют собой продолжения ФИГ. 21A).

[0050] ФИГ. 22А - 22В. Ингибирование повреждения нейромышечного синапса. На ФИГ. 22А нейромышечные синапсы окрашивали альфа-бунгаротоксином, и синаптические везикулы и концевую пластинку окрашивали SV2 и 2НЗ. На ФИГ. 22В представлено подсчитанное количество иннервированных концевых пластинок.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0051] AIMP2-DX2 представляет собой альтернативный, антагонистический сплайс-вариант AIMP2 (взаимодействующего с комплексом аминоксил-тРНК-синтазы многофункционального белка 2), который представляет собой мультифакториальный апоптоический ген. Известно, что AIMP2-DX2 подавляет апоптоз клеток, препятствуя функциям AIMP2.

[0052] AIMP2-DX2, действуя как конкурентный ингибитор AIMP2, подавляет опосредованный TNF-альфа апоптоз посредством ингибирования убиквитинирования/деградации TRAF2. Кроме того, AIMP2-DX2 ранее был идентифицирован как фактор, вызывающий рак легких.

[0053] Также было установлено, что AIMP2-DX2 может лечить нейрональные заболевания (US2019/0298858 A1).

[0054] В соответствии с настоящим изобретением предложены способы отсрочивания начала заболевания у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

[0055] В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования гибели нервных клеток у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

[0056] В соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения мышечной атрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2). В некоторых вариантах реализации у субъекта присутствует боковой амиотрофический склероз (БАС). В некоторых вариантах реализации у субъекта присутствует спинальная мышечная атрофия (СМА).

[0057] В соответствии с настоящим изобретением предложены способы повышения уровня выживаемости или увеличения продолжительности жизни субъекта с болезнью

Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0058]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы предотвращения расстройства поведения, восстановления двигательного симптома и/или уменьшения нейронального повреждения у субъекта с болезнью Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0059]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования вызванной олигомером бета-амилоида (A $\beta$ -O) гибели нервных клеток или вызванной A $\beta$ -O экспрессии p53 у субъекта с болезнью Альцгеймера (БА), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0060]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС) у субъекта со спинальной мышечной атрофией (СМА), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0061]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС), ингибирования вызванной блокированием НМС дыхательной недостаточности, затруднения дыхания, ингибирования вызванной блокированием НМС мышечной судороги или фасцикуляции у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0062]** В соответствии с настоящим изобретением предложены способы подавления аноикиса и/или повышения стабилизации рецептора ламинина у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), болезнью Паркинсона (БП), включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0063]** Также предложены способы ингибирования воспаления у субъекта с БАС, способы предотвращения расстройства поведения, ингибирования гибели нервных клеток и/или мышечной атрофии у субъекта с БП, способы снятия двигательных симптомов у субъекта с БП, способы лечения болезни Альцгеймера (БА) у субъекта с БА и/или способы лечения врожденной мышечной дистрофии, рассеянного склероза, мышечной дистрофии, тяжелой миастении, миопатии, миозита (включая полимиозит и

дерматомиозит), периферической нейропатии, спинальной мышечной атрофии и/или другого вызванного гибелью клеток заболевания ЦНС у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

**[0064]** Рекомбинантный вектор, описанный в настоящей заявке, может дополнительно содержать последовательность-мишень miR-142. Вектор может дополнительно содержать промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2. В некоторых вариантах реализации указанный промотор представляет собой промотор ретровируса (LTR), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор EF-1-альфа, промотор UB6, промотор бета-актина курицы, промотор СAG, промотор RPE65, промотор синапсина, промотор MeCP2, промотор CaMKII, промотор Hb9 или промотор опсина.

**[0065]** В способах, описанных в настоящей заявке, в некоторых вариантах реализации рекомбинантные векторы содержат вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2) и последовательность-мишень miR-142. Последовательность-мишень miR-142 может находиться с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2. Векторы, описанные в настоящей заявке, могут экспрессировать AIMP2-DX2 в нервных клетках, но не в гематопоэтических клетках, таких как лейкоциты и лимфоидные клетки. Таким образом, векторы, описанные в настоящей заявке, могут быть полезны для специфичного нацеливания на нервные клетки для лечения нейрональных заболеваний.

**[0066]** Полипептид AIMP2-DX2 (SEQ ID NO: 2) представляет собой сплайс-вариант AIMP2 (например, последовательность АК SEQ ID NO: 12; например, последовательность нт SEQ ID NO: 3), в котором второй экзон (SEQ ID NO: 10; последовательность нт SEQ ID NO: 4) AIMP2 отсутствует. В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 имеет последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 1, и полипептид AIMP2-DX2 имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 2. Варианты или изоформы полипептида AIMP2-DX2 также известны, и их могут определить специалисты в данной области техники (см., например, последовательности SEQ ID NO: 13 - 19). Например, на ФИГ. 21А - 21С показано сравнение AIMP2 (SEQ ID NO: 2) и вариантов, SEQ ID NO: 13 - 19, а также консенсусной или коровой последовательности (SEQ ID NO: 20).

**[0067]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 может содержать последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по

меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или идентична на любой диапазон % между указанными значениями. Ген AIMP2-DX2 может содержать последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

**[0068]** Ген AIMP2-DX2 может содержать последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 1, идентичную на любой диапазон % между указанными значениями. Ген AIMP2-DX2 может содержать последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 1.

**[0069]** В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 4.

**[0070]** Последовательность-мишень miR-142 (miR-142T) может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСАСТА. Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 5. Например, последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСАСТА и совокупность 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 дополнительных нуклеотидов, которые примыкают с 5'- или 3'-стороны к последовательности АСАСТА, которая представлена в SEQ ID NO: 5.

**[0071]** Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична или 100% идентична последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA; miR-142-3pT). Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5.

**[0072]** Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСТТТА. Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 7. Например, последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, содержащую АСТТТА и совокупность 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дополнительных нуклеотидов, которые примыкают с 5'- или 3'-стороны к последовательности АСАСТА, которая представлена в SEQ ID NO: 7.

**[0073]** Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 50% идентична, по меньшей мере на 60% идентична, по меньшей мере на 70% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 93% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 96% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична или на 100% идентична последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5pT). Последовательность-мишень miR-142 может содержать последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7.

**[0074]** Пример мутантной последовательности miR142-3pT представляет собой:

```
Ccgctgcagtgtagcagtgccagccaatgtgcagaggtggatgaggtcttgtaaaccctggctcctttaacacggcctcaagct  
ccttaagtgaccagaagcttgtagctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAagat  
atctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAaaagcttgtaggatccgcc (SEQ  
ID NO: 25).
```

**[0075]** Мутантная последовательность относится к одной или более областям, например, четырем областям, коровых последовательностей miR142-3pT, которые заменены, как



описано далее: (5'-ААСАСТАС-3' → 5'-ССАСТГСА-3'). Наблюдали ингибирование экспрессии DX2 в трансфицированных вектором клетках НЕК293 с последовательностью-мишенью miR142-3p - miR142-3p x1 повтор (100 пмоль), и при увеличении количества коровых последовательностей для связывания в последовательности-мишени miR142-3p, ингибирование посредством miR142-3p экспрессии DX2 также повышалось. Для вектора, содержащего коровую последовательность Tseq x3, выявили значимое ингибирование, тогда как для мутированной 3x последовательности не наблюдали ингибирования.

**[0076]** МикроРНК (миРНК) представляет собой некодирующую молекулу РНК, функция которой состоит в контроле экспрессии генов. МикроРНК функционируют путем спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекулах мРНК, т. е., с последовательностями-мишенями микроРНК. МикроРНК могут связываться с транскриптами матричной РНК (мРНК)-мишени белок-кодирующих генов и отрицательно контролировать их трансляцию или вызывать деградацию мРНК. В настоящее время идентифицировано более 2000 микроРНК человека, и базы данных miRbase находятся в открытом доступе. Многие микроРНК экспрессируются тканеспецифическим образом и играют важную роль в поддержании тканеспецифических функций и дифференцировки.

**[0077]** МикроРНК действует на посттранскрипционной стадии экспрессии генов, и, в случае млекопитающих, известно, что приблизительно 60% экспрессии гена контролируется микроРНК. МикроРНК играет важную роль в различных процессах в живом организме и, как было показано, имеет корреляцию с раком, расстройствами сердечной деятельности и расстройствами нервной системы. Например, miR-142-3p и miR-142-5p присутствуют в miR-142, и можно использовать любую из их последовательностей-мишеней. Таким образом, «miR-142» или «микроРНК-142» относится, например, к miR-142-3p и/или miR-142-5p, и может связываться с последовательностью-мишенью miR-142, например, miR-142-3pT или miR-142-5pT.

**[0078]** Последовательность-мишень miR-142 может находиться с 5'- или с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2.

**[0079]** Например, «miR-142-3p» может присутствовать в области, в которой происходит транслокация ее гена при агрессивном В-клеточном лейкозе, и которая, как известно, экспрессируется в гемопоэтических тканях (костном мозге, селезенке и тимусе и т. д.) Кроме того, известно, что miR-142-3p участвует в дифференцировке гемопоэтической

системы, ее экспрессия подтверждена в печени эмбриона мыши (гематопозитической ткани мыши).

**[0080]** В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень miR-142-3p и/или miR-142-5p повторяется по меньшей мере 2 - 10 раз, по меньшей мере 2 - 8 раз, по меньшей мере 2 - 6 раз, по меньшей мере 4 раза или любой диапазон или количество раз между ними.

**[0081]** В качестве примера, miR-142-3p, например, имеющая последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 23, может содержать соответствующую последовательность-мишень, например, последовательность-мишень miR-142-3p (miR-142-3pT), имеющую последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5, но не ограниченную ею. MiR-142-5p, например, имеющая последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 24, может содержать соответствующую последовательность-мишень, например, последовательность-мишень miR-142-5p (miR-142-5pT), имеющую последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7, но не ограниченную ею.

**[0082]** В некоторых вариантах реализации miR-142-3p может иметь последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 23, и miR-142-5p может иметь последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 24.

**[0083]** В соответствии с настоящим изобретением предложены рекомбинантные векторы, которые могут контролировать побочный эффект сверхэкспрессии варианта AIMP2-DX2 в опухоли путем вставки последовательности-мишени miR-142-3p и/или miR-142-5p (miR-142-3pT и/или miR-142-5pT, соответственно) в конец AIMP2-DX2 и контролирования подавления экспрессии AIMP2-DX2 в CD45-положительных клетках, в частности, в лимфатической системе и лейкоцитах. Таким образом, экспрессия варианта AIMP2-DX2 может быть ограничена только получившими инъекцию нейрональными клетками и тканями, но не присутствовать в отличных от нейрональных гемопозитических клетках - основной популяции в инъецированных областях ткани. MiR142-3p экспрессируется только в гематопозитических клетках.

**[0084]** В соответствии с настоящим изобретением предложены рекомбинантные векторы, содержащие последовательность-мишень miR-142-3p и/или miR-142-5p. В соответствии с настоящим изобретением предложены рекомбинантные векторы, содержащие вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2) и последовательности-мишени miR-142-3p и/или miR-142-5p, описанные в настоящей заявке.

**[0085]** Термин «рекомбинантный вектор» относится к вектору, который может быть экспрессирован в качестве белка-мишени или РНК-мишени в соответствующих клетках-

хозяевах, и генетической конструкции, которая содержит необходимый функционально связанный контролирующий фактор для обеспечения возможности надлежащей экспрессии вставленного гена.

**[0086]** Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты, и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок-мишень и РНК-мишень для выполнения обычных функций. Например, она может влиять на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует промотор и белок или РНК, которые были связаны для функционирования последовательности нуклеиновой кислоты. Функциональную связь с рекомбинантным вектором можно создать с применением технологии рекомбинантных генов, которая хорошо известна в соответствующей области техники и в которой применяют общеизвестные ферменты в соответствующей области техники для сайт-специфического расщепления и соединения ДНК.

**[0087]** Рекомбинантные векторы могут дополнительно содержать промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации указанный промотор представляет собой промотор ретровируса (LTR), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор EF-1-альфа, промотор UB6, промотор бета-актина курицы, промотор СAG, промотор RPE65, промотор синапсина, промотор MeCP2, промотор CaMKII, промотор Hb9 или промотор опсина.

**[0088]** Указанный рекомбинантный вектор может дополнительно содержать гетерогенный промотор и функционально связанный с указанным промотором гетерогенный ген.

**[0089]** «Гетерогенный ген» в настоящей заявке может включать белок или полипептид с биологически подходящей активностью, и закодированную последовательность продукта-мишени, такого как иммуноген или антигенный белок или полипептид, или активируемый обработкой белок или полипептид.

**[0090]** Полипептиды могут восполнять недостаточность или отсутствие экспрессии эндогенного белка в клетках-хозяевах. Последовательность гена может происходить из различных источников, включая ДНК, кДНК, синтезированную ДНК, РНК или их комбинации. Последовательность гена может содержать геномную ДНК, которая содержит или не содержит природный интрон. Кроме того, геномная ДНК может быть получена вместе с последовательностью промотора или последовательностью

полиаденилирования. Геномная ДНК или кДНК может быть получена различными способами. Геномная ДНК может быть выделена и очищена из соответствующих клеток с помощью способа, общеизвестного в соответствующей области техники. Или можно применять мРНК для получения кДНК с помощью обратной транскрипции или другого способа путем выделения из клеток. Или полинуклеотидная последовательность может содержать последовательность, комплементарную последовательности РНК, например, антисмысловой последовательности РНК, и указанную антисмысловую РНК можно вводить индивиду для подавления экспрессии комплементарного полинуклеотида в клетках индивида.

**[0091]** Например, гетерогенный ген представляет собой сплайс-вариант AIMP-2 с утратой экзона 2, и последовательность-мишень miR-142-3p может быть связана с 3'-НТО гетерогенного гена. Последовательность белка AIMP2 (вариант 312 АК: AAC50391.1 или GI: 1215669; вариант 320 АК: AAN13630.1, GI: 15489023, BC0 13630.1) описана в литературе (вариант 312 АК: Nicolaides, N.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, *Genomics* 29 (2), 329-334 (1995); вариант 320 АК: Generation and initial analysis of more than 15, 000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26), 16899-16903 (2002)).

**[0092]** Термин «сплайс-вариант AIMP2» относится к варианту, полученному в результате частичной или полной утраты экзона 2 из экзонов 1 - 4. Таким образом, этот вариант означает нарушение нормальной функции AIMP2 путем образования белка и гетеродимера AIMP2. Введенный путем инъекции ген AIMP2-DX2 редко экспрессируется в тканях, отличных от ткани, в которую осуществили инъекцию. Тем не менее, в качестве дополнительной меры безопасности можно вставить последовательность-мишень miR142, чтобы полностью заблокировать возможность экспрессии AIMP2-DX2 в гематопозитических клетках - основной популяции не являющихся нервными клеток в области ткани, в которую осуществили инъекцию.

**[0093]** Рекомбинантный вектор может содержать SEQ ID NO: 1 и 5.

**[0094]** «% гомологии последовательности», «% идентичности» или «идентичный на %» последовательности нуклеотидов или аминокислот можно, например, подтвердить путем сравнения 2 оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, и часть из указанных последовательностей нуклеотидов в окне сравнения может содержать вставку или делецию (то есть, гэп) по сравнению с эталонной

последовательностью при оптимальном выравнивании указанных 2 последовательностей (не содержит вставку или делецию).

**[0095]** Белок, описанный в настоящей заявке, включает не только белки с последовательностью аминокислот дикого типа, но и белки с вариантами последовательности аминокислот.

**[0096]** Варианты белка означают белки с различными последовательностями вследствие делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены, или их комбинации, более чем 1 аминокислотного остатка в природной последовательности аминокислот. Замена аминокислоты в белке и пептиде, которая не изменяет активацию молекулы в целом, известна в данной области техники (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979).

**[0097]** Белок или его вариант можно получить путем выделения из природного источника, синтеза (Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-2156, 1963) или генетической рекомбинации на основе последовательности ДНК (Sambrook et al, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 1989).

**[0098]** Мутации аминокислот можно осуществить на основании относительного сходства заместителей в боковой цепи аминокислоты, такого как гидрофильность, гидрофобность, электрический заряд и размер, и т.д. В соответствии с анализом размера, формы и типов заместителей в боковой цепи аминокислот можно определить, что аргинин, лизин и гистидин являются остатками с положительным зарядом; аланин, глицин и серин имеют сходные размеры; фенилаланин, триптофан и тирозин имеют сходные формы. Следовательно, на основании таких соображений аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; и фенилаланин, триптофан и тирозин с биологической точки зрения могут считаться функциональными эквивалентами.

**[0099]** При введении одной или более мутаций можно учитывать индекс гидрофобности аминокислоты. Индекс гидрофобности определен для каждой аминокислоты в соответствии с гидрофобностью и зарядом: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспаргат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

**[0100]** При определении такой биологической функции белка как способность к взаимодействию, индекс гидрофобности аминокислоты очень важен. Сходной биологической активности можно добиться, только если введена замена на

аминокислоту со сходным индексом гидрофобности. В случае введения мутации с учетом индекса гидрофобности, вводят замену на аминокислоту с отличием индекса гидрофобности в пределах  $\pm 2$ , в пределах  $\pm 1$  или в пределах  $\pm 0,5$ .

**[0101]** При этом также хорошо известно, что в результате замены на аминокислоты со сходным индексом гидрофильности можно получить белки с эквивалентной биологической активностью. Как указано в патенте США № 4,554,101, каждому из аминокислотных остатков присвоены следующие индексы гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспаргат (+3,0  $\pm 1$ ); глутамат (+3,0  $\pm 1$ ); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5  $\pm 1$ ); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4).

**[0102]** В случае введения одной или более мутаций с учетом индексов гидрофильности, можно ввести замену на аминокислоту с отличием индекса гидрофильности в пределах  $\pm 2$ , в пределах  $\pm 1$  или в пределах  $\pm 0,5$ , но не ограничиваясь ими.

**[0103]** Замена аминокислоты в белке, которая не изменяет активацию молекулы в целом, известна в данной области техники (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются замены между аминокислотными остатками, включая: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly. Векторную систему можно сконструировать с помощью различных способов, опубликованных в соответствующей области техники. Конкретные способы описаны в Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**[0104]** Векторы, описанные в настоящей заявке, можно сконструировать в виде обычных векторов для клонирования или для экспрессии. Кроме того, векторы можно сконструировать для прокариотических или эукариотических клеток в качестве хозяина. Если вектор представляет собой вектор экспрессии, и в качестве хозяина используют прокариотическую клетку, то он, как правило, содержит сильный промотор для осуществления транскрипции (например, промотор *tac*, промотор *lac*, промотор *lacUV5*, промотор *lpp*, промотор *pL X*, промотор *pRX*, промотор *gac5*, промотор *amp*, промотор *gcsA*, промотор *SP6*, промотор *trp* и промотор *T7*, и т.д.), сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательность терминации транскрипции/трансляции. В случае использования *E. coli* (например, HB101, BL21, DH5a и т.д.) в качестве клетки-хозяина, в качестве контролируемых последовательностей можно применять

последовательности промотора и оператора пути биосинтеза триптофана в *E. coli* (Yanofsky, C.(1984), J. Bacteriol., 158: 1018-1024) и левосторонний промотор фага X (промотор pLX, Herskowitz, I. and Hagen, D.(1980), Ann. Rev. Genet., 14: 399-445).

**[0105]** При этом векторы, которые можно применять, могут быть одного или более из типов, таких как вирусный вектор, линейная ДНК или плазмидная ДНК.

**[0106]** «Вирусный вектор» относится к вирусному вектору, способному доставлять ген или генетический материал в желательные клетки, ткань и/или орган.

**[0107]** Хотя вирусные векторы могут включать один или более из видов, выбранных из группы, состоящей из: аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, ВИЧ (вируса иммунодефицита человека), MLV (вируса лейкоза мышей), ASLV (вируса саркомы/лейкоза птиц), SNV (вируса некроза селезенки), RSV (вируса саркомы Рауса), MMTV (вируса опухоли молочной железы мышей) и вируса простого герпеса, они не ограничены перечисленными видами. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор может представлять собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, вируса коровьей оспы или вируса простого герпеса.

**[0108]** Хотя ретровирус обладает способностью встраиваться в геном клеток-хозяев и безвреден для организма человека, он может обладать свойствами, включающими подавление функций нормальных клеток во время встраивания, способность инфицировать разнообразный диапазон клеток, простоту пролиферации, он может вмещать приблизительно 1 - 7 т.п.н. чужеродного гена и образует неспособный к репликации вирус. Тем не менее, ретровирусы также могут иметь недостатки, включая трудности при инфицировании клеток после митотического деления, доставку генов в условиях *in vivo* и необходимость пролиферации соматических клеток в условиях *in vitro*. Кроме того, ретровирусы подвержены риску спонтанных мутаций, поскольку они могут быть встроены в протоонкоген, тем самым приводя к возможности некроза клеток.

**[0109]** При этом аденовирусы обладают рядом преимуществ в качестве вектора клонирования, включая репликацию даже в ядре клеток среднего размера, отсутствие клинической токсичности, стабильность даже при вставке чужеродного гена, отсутствие перестройки или утраты генов, трансформацию эукариотического организма и стабильную экспрессию на высоком уровне даже при встраивании в хромосому клетки-хозяина. Хорошие клетки-хозяева аденовирусов представляют собой клетки, которые являются причинами гематопоэтических, лимфатических и миеломных заболеваний у человека. Тем не менее, пролиферация затруднена, поскольку это линейная ДНК, и

нелегко выделить инфицирующий вирус, наряду с низким уровнем инфицирования вирусом. Кроме того, экспрессия доставленного гена наиболее выражена в течение 1 - 2 недель, причем экспрессия сохраняется в течение 3 - 4 недель только в некоторых клетках. Другой проблемой является его высокая иммуногенность.

**[0110]** Аденоассоциированный вирус (AAV) оказывался предпочтительным в последние годы, поскольку он может решить упомянутые выше проблемы и обладает множеством преимуществ в качестве генотерапевтического агента. Его также называют аденосателлитным вирусом. Диаметр частицы аденоассоциированного вируса составляет 20 нм, и известно, что практически не причиняет вреда организму человека. По этой причине были одобрены его продажи в Европе в качестве генотерапевтического агента.

**[0111]** AAV представляет собой провирус с одноцепочечным геномом, который нуждается во вспомогательном вирусе для репликации, и геном AAV содержит 4680 п.о., которые могут встраиваться в определенную область хромосомы 19 инфицированных клеток. Трансген вставляют в ДНК плазмиды, соединяя с 2 фрагментами последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR), каждый длиной 145 п.о., и фрагментом сигнальной последовательности. Трансфекция происходит наряду с другой плазмидной ДНК, которая экспрессирует гены гер и сар AAV, и аденовирус добавляют в качестве вспомогательного вируса. Преимущества AAV состоят в широком диапазоне клеток-хозяев, в которые доставляют гены, небольших иммунологических побочных эффектах при повторном введении и длительном периоде экспрессии генов. Более того, он безопасен, даже если геном AAV встраивается в хромосому клеток-хозяев, и не изменяет или не перестраивает экспрессию генов хозяина.

**[0112]** Известно, что аденоассоциированный вирус имеет в общей сложности 4 серотипа. Среди многих серотипов аденоассоциированных вирусов, которые можно использовать для доставки гена-мишени, наиболее широко исследованным вектором является аденоассоциированный вирус серотипа 2, который в настоящее время применяют для доставки клинических генов муковисцидоза, гемофилии и болезни Канавана. Кроме того, в последнее время возрастает потенциал рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в области генотерапии рака. В настоящем изобретении также использовали аденоассоциированный вирус серотипа 2. Хотя можно выбрать и применить подходящий вирусный вектор, он не ограничен указанным вектором.

**[0113]** Кроме того, если векторы представляют собой векторы экспрессии и используют эукариотические клетки в качестве хозяина, то можно применять промотор,



происходящий из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина), или промотор, происходящий из вируса млекопитающего (например, поздний промотор аденовируса, промотор вируса коровьей оспы 7,5 кД, промотор SV40, промотор цитомегаловируса и промотор ТК HSV). В частности, хотя он может включать один или более из видов, выбранных из группы, состоящей из промоторов, выбранных из группы, состоящей из LTR ретровируса, промотора цитомегаловируса (ЦМВ), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора МТ, промотора EF-1-альфа, промотора UB6, промотора бета-актина курицы, промотора СAG, промотора RPE65 и промотора опсина, он не ограничен перечисленными промоторами. Более того, как правило, вектор содержит последовательность полиаденилирования в качестве последовательности терминации транскрипции.

**[0114]** Векторы, описанные в настоящей заявке, при необходимости могут быть соединены с другими последовательностями, чтобы облегчить очистку белка. Хотя можно использовать такую присоединенную последовательность как, например, последовательность глутатион-S-трансферазы (Pharmacia, США), связывающего мальтозу белка (NEB, США), FLAG (IBI, США) и 6xHis (гексагистидин; Quiagen, США) и т.д., она не ограничена перечисленными последовательностями. Кроме того, векторы экспрессии могут содержать ген устойчивости к антибиотикам, обычно применяемый в данной области техники в качестве селективного маркера, включая ген устойчивости к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину, в качестве примера.

**[0115]** Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложены носители генов, включая рекомбинантный вектор, содержащий последовательность-мишень (miR-142-3pT и/или miR-142-5pT) miR-142, такой как miR-142-3p и/или miR-142-5p, соответственно.

**[0116]** Термин «перенос генов» в общем включает доставку генетического материала в клетки для транскрипции и экспрессии. Этот способ идеально подходит для целей экспрессии белка и лечения. Опубликован широкий диапазон способов доставки, таких как трансфекция ДНК и трансдукция вирусом. Это означает опосредованный вирусом перенос генов благодаря возможности нацеливания на специфические рецепторы и/или типы клеток посредством высокой эффективности доставки и высокого уровня экспрессии доставленных генов, и, при необходимости, безопасность для природы или псевдотипирование.

[0117] Носители генов могут представлять собой трансформированный объект, который был трансформирован в рекомбинантный вектор, и трансформация включает все способы внедрения нуклеиновой кислоты в органический объект, клетки, ткани или органы, и как известно в данной области техники, можно выбрать и использовать подходящую стандартную технологию, в зависимости от клеток-хозяев. Хотя такие способы включают электропорацию, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция ( $\text{CaPO}_4$ ), осаждение хлоридом кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), смешивание с волокнами карбида кремния, опосредованную агробактериями трансформацию, опосредованную ПЭГ, сульфатом декстрана и липофектамином трансформацию, и т.д., они не ограничены перечисленными способами.

[0118] Носители генов предназначены для экспрессии гетерогенных генов в нейронах. Таким образом, подавляется экспрессия гетерогенного гена в CD45-положительных клетках и может повышаться экспрессия гетерогенного гена в ткани головного мозга. Большая часть CD45 представляют собой трансмембранную протеин-тирозинфосфатазу, находящуюся на гематопозитической клетке. Клетки можно идентифицировать по молекулам, находящимся на поверхности клетки, и CD45 является клеточным маркером для всех групп лейкоцитов и В-лимфоцитов. Носитель гена не экспрессируется в CD45-положительных клетках, в частности, в клетках лимфоидного и лейкоцитарного происхождения.

[0119] Носители генов могут быть дополнительно включены в состав, содержащий носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, позволяющие их применение в фармакологии.

[0120] Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложены способы доставки гетерогенного гена в нейрон и экспрессии в нем, которые включают этап введения рекомбинантного вектора в соответствующий объект.

[0121] Указанные способы могут повышать экспрессию гетерогенного гена в тканях головного мозга и контролировать экспрессию гетерогенного гена в других тканях.

[0122] Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложены векторы, содержащие 1) промотор; 2) последовательность нуклеотидов, которая кодирует белок-мишень, связанный с промотором для обеспечения функционирования; и 3) кассету экспрессии, которая содержит последовательность нуклеотидов, нацеливающую miR-142-3p, встроенную в 3'-НТО указанной последовательности нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации векторы могут содержать 1) промотор; 2) последовательность

нуклеотидов, которая кодирует белок-мишень, связанный с промотором для обеспечения функционирования; и 3) кассету экспрессии, которая содержит последовательность нуклеотидов, нацеливающую miR-142-5p, вставленную в 3'-НТО указанной последовательности нуклеотидов.

**[0123]** Термин «кассета экспрессии» относится к единой кассете, которая может осуществлять экспрессию для продукции и секреции белка-мишени, функционально связанного с сигнальным пептидом, поскольку она содержит ген, который кодирует белок-мишень, и последовательность нуклеотидов, которая кодирует промотор и сигнальный пептид. Для секреции кассету экспрессии в соответствии с настоящим изобретением можно применять в смеси с системой секреции. Широкий диапазон факторов, которые могут способствовать эффективной продукции белка-мишени, могут быть включены в такую кассету экспрессии или доставлены вне ее.

**[0124]** Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложены профилактические или терапевтические препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний, которые содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует сплайс-вариант AIMP-2 с утратой экзона 2, и последовательность нуклеотидов, которая нацеливает miR-142-3p, вставленную в 3'-НТО указанной последовательности нуклеотидов.

**[0125]** Следовательно, также в соответствии с настоящим изобретением предложены способы лечения нейронального заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение любого из векторов, описанных в настоящей заявке. Хотя нейродегенеративные заболевания могут представлять собой одно или более из заболеваний, выбранных из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза (БАС), дегенерации сетчатки, умеренного когнитивного нарушения, мультиинфарктной деменции, лобно-височной деменции, деменции с тельцами Леви, болезни Гентингтона, нейродегенеративного заболевания, метаболических нарушений в головном мозге, депрессии, эпилепсии, рассеянного склероза, кортикобазальной дегенерации, множественной системной атрофии, прогрессирующего надъядерного паралича, дентаторубропаллидолюисовой атрофии, спиноцереbellлярной атаксии, первичного бокового склероза, спинальной мышечной атрофии и инсульта, они не ограничены перечисленными заболеваниями. В некоторых вариантах реализации нейрональное заболевание представляет собой БАС. Лечение может улучшать память, дискинезию, двигательную активность и/или

увеличивать продолжительность жизни субъекта с нейрональным заболеванием, например, БАС, болезнью Альцгеймера или болезнью Паркинсона. В некоторых вариантах реализации лечение может улучшать двигательную активность и/или увеличивать продолжительность жизни субъекта с нейрональным заболеванием, например, с БАС.

**[0126]** Векторы, описанные в настоящей заявке, могут действовать, без ограничения, на ингибирование апоптоза, снижение выраженности дискинезии и/или ингибирование окислительного стресса, и, следовательно, предотвращать или лечить нейрональные заболевания.

**[0127]** Термин «лечение» включает не только полное излечение от нейродегенеративных заболеваний, но также частичное лечение, улучшение и/или уменьшение общих симптомов нейродегенеративных заболеваний в результате применения фармакологических агентов, описанных в настоящей заявке.

**[0128]** Термин «предотвращение» означает заблаговременное предотвращение возникновения общих симптомов нейродегенеративных заболеваний путем подавления или блокирования таких симптомов или признаков, как нарушение когнитивных функций, расстройство поведения и разрушение нейронов головного мозга, путем применения фармакологических агентов, описанных в настоящей заявке.

**[0129]** Адьюванты, отличные от активных ингредиентов, можно добавить дополнительно к фармакологическим агентам, описанным в настоящей заявке. Хотя можно применять любой адьювант без ограничений при условии, что он известен в данной области техники, можно повысить иммунитет путем дополнительного добавления, например, полного и неполного адьюванта Фрейнда.

**[0130]** Фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, могут быть произведены в формате смеси активных ингредиентов с фармакологически приемлемым носителем. Здесь фармакологически приемлемый носитель включает носитель, вспомогательное вещество и разбавитель, обычно применяемые в области фармакологии. Фармакологически приемлемый носитель, который можно применять для фармакологических агентов, описанных в настоящей заявке, включает лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, малит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло, но не ограничивается ими.

**[0131]** Фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, можно применять путем производства в различных форматах, включая типы для перорального введения, такие как порошок, гранула, пилюля, капсула, суспендированный раствор, эмульсия, сироп и аэрозоль и т. д., и для наружного применения, в виде суппозиторного лекарственного средства или стерилизованного раствора для инъекций, и т. д., в соответствии с их соответствующими обычными способами производства.

**[0132]** При производстве препаратов можно применять разбавители или вспомогательные вещества, такие как наполнитель, разбавитель, связующий агент, увлажнитель, дезинтегрирующий агент и поверхностно-активное вещество и т. д., которые обычно применяют при производстве. Твердые препараты для перорального введения включают препараты в виде пилюль, таблеток, порошка, гранул и капсул, и такие твердые препараты могут быть произведены путем смешивания более чем одного вспомогательного вещества, такого как крахмал, карбонат кальция, сахароза, лактоза и желатин, с активными ингредиентами. Кроме того, также можно применять лубриканты, такие как стеарат магния и тальк, в дополнение к простым вспомогательным веществам. Жидкие препараты для перорального введения включают суспендированный раствор, раствор для внутреннего применения, масло и сироп и т. д. с включением различных вспомогательных веществ, таких как увлажнитель, подсластитель, ароматизатор и консервант и т. д., помимо воды и жидкого парафина, которые являются обычно применяемыми разбавителями. Препараты для отличного от перорального введения включают стерилизованный водный раствор, неводный растворитель, суспензионный агент, масло, лиофилизированный агент и суппозиторий. В качестве неводного растворителя и суспензионного раствора можно применять растительное масло, такое как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и оливковое масло, и сложные эфиры для инъекций, такие как этилат. Агенты для суппозитория могут включать витепсол, твин 61, масло какао, лауриновое масло и глицерожелатин и т. д.

**[0133]** Фармакологические агенты можно вводить субъекту или в объект различными путями. Можно применять все форматы введения, такие как пероральное введение и внутривенная, мышечная, подкожная и интраперитонеальная инъекция.

**[0134]** Желательные дозы введения терапевтических агентов, описанных в настоящей заявке, различаются в зависимости от различных факторов, включая способ получения препарата, формат введения, возраст, массу тела и пол пациента, степень симптомов заболевания, диету, период введения, путь введения, скорость выведения, аллергические реакции и т. д. Тем не менее, они могут быть выбраны соответствующим производителем.

Однако для эффекта лечения квалифицированный врач может определить и назначить эффективную дозу для целевого лечения. Например, агенты для лечения вводят путем внутривенной, подкожной и мышечной инъекции и инъекции напрямую в желудочек головного мозга или в спинной мозг с применением микроиглы. Возможны многократные инъекции и повторные введения, например, эффективная доза составляет от 0,05 до 15 мг/кг в случае вектора, от  $5 \times 10^{11}$  до  $3,3 \times 10^{14}$  вирусных частиц (от  $2,5 \times 10^{12}$  до  $1,5 \times 10^{16}$  МЕ)/кг в случае рекомбинантного вируса и от  $5 \times 10^2$  до  $5 \times 10^7$  клеток/кг в случае клеток. Желательно, чтобы дозы составляли от 0,1 до 10 мг/кг в случае вектора, от  $5 \times 10^{12}$  до  $3,3 \times 10^{13}$  частиц (от  $2,5 \times 10^{13}$  до  $1,5 \times 10^{15}$  МЕ)/кг в случае рекомбинантного вируса и от  $5 \times 10^3$  до  $5 \times 10^6$  клеток/кг в случае клеток при частоте от 2 до 3 введений в неделю. Доза строго не ограничена. Скорее, она может быть модифицирована в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления неврологического расстройства. Эффективная доза других инъекций в подкожный жир и мышцу и для введения напрямую в пораженную область составляет от  $9 \times 10^{10}$  до  $3,3 \times 10^{14}$  частиц рекомбинантного вируса с шагом 10 см и при частоте введений 2 - 3 раза в неделю. Доза строго не ограничена. Скорее, она может быть модифицирована в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления неврологического расстройства. В частности, фармакологический агент в соответствии с настоящим изобретением содержит от  $1 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{12}$  гв (геномов вируса)/мл рекомбинантного аденоассоциированного вируса, и, как правило, рекомендуется вводить инъекцию  $1 \times 10^{12}$  гв один раз в 2 дня в течение 2 недель. Ее можно вводить один раз в день или путем деления дозы на несколько введений в течение дня. В некоторых вариантах реализации векторы можно вводить в дозе, составляющей от  $0,1 \times 10^8$  гв до  $500 \times 10^8$  гв, от  $1 \times 10^8$  гв до  $100 \times 10^8$  гв, от  $1 \times 10^8$  гв до  $10 \times 10^8$  гв, например,  $5 \times 10^8$  гв, или любых диапазонах, полученных из них. Для внутривенных инъекций, например, гв можно пересчитать в дозы для человека на основании массы тела для внутривенной инъекции. Для местных инъекций в ткань, например, гв также можно пересчитать в дозы для человека на основании количества клеток-мишеней и эффективной МОИ (множественность заражения).

**[0135]** В некоторых вариантах реализации векторы, описанные в настоящей заявке, можно ввести субъекту путем, например, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции или субхориоидальной инъекции. Инъекция может быть в виде жидкости. В других вариантах реализации векторы, описанные в настоящей заявке, можно ввести субъекту в виде глазных капель или мази.

**[0136]** Фармакологические препараты можно получить в большом разнообразии форматов для перорального и отличного от перорального введения. В некоторых вариантах реализации вектор, описанный в настоящей заявке, можно вводить в головной мозг или спинной мозг. В некоторых вариантах реализации векторы, описанные в настоящей заявке, можно вводить в головной мозг путем стереотаксической инъекции.

**[0137]** Агенты для перорального введения включают пилюли, таблетки, твердые и мягкие капсулы, жидкость, суспендированный раствор, масла, сироп и гранулы и т. д. Эти агенты могут содержать разбавитель (например, лактозу, декстрозу, сахарозу, маннит, сорбит, целлюлозу и/или глицин) и скользящие вещества (например, диоксид кремния, тальк и стеариновую кислоту и ее соли магния или кальция и/или полиэтиленгликоль) в дополнение к активным ингредиентам. Кроме того, пилюли могут содержать связующие агенты, такие как алюмосиликат магния, крахмальная паста, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и/или поливинилпирролидон, и, в зависимости от ситуации, могут содержать разрыхлитель, такой как крахмал, агар, альгиновая кислота или ее натриевая соль или аналогичная смесь, и/или абсорбент, краситель, ароматизатор и подсластитель. Агенты могут быть получены обычными способами смешивания, гранулирования или нанесения покрытия.

**[0138]** Кроме того, агенты для инъекций являются типичными препаратами для введения, отличного от перорального. Растворители для таких агентов для инъекций включают воду, раствор Рингера, изотонический физиологический раствор и суспензию. В качестве растворителя или суспензионной среды можно применять стерилизованное нелетучее масло инъекционного агента, и для этой цели можно применять любое нераздражающее нелетучее масло, включая моно- и диглицерид. Кроме того, в агенте для инъекции могут использоваться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

**[0139]** Настоящее изобретение будет объяснено более подробно с помощью следующих примеров реализации, описанных ниже. Тем не менее, следующие примеры реализации предназначены только для целей уточнения содержания настоящего изобретения и не ограничивают применение настоящего изобретения такими примерами.

## ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение рекомбинантного вектора.

**[0140]** Большая часть CD45 представляет собой трансмембранную протеин-тирозинфосфатазу гематопозитической клетки, которую можно использовать для идентификации клеток по молекуле на поверхности клетки. CD45 является маркером

всех групп лейкоцитов и В-лимфоцитов. Был получен рекомбинантный вектор, который экспрессируется специфически и только в нейронах и не экспрессируется в CD45-положительных клетках, в частности, в клетках лимфоидного и лейкоцитарного происхождения. Указанный рекомбинантный вектор содержит сплайс-вариант, в котором удален экзон 2 взаимодействующего с комплексом аминоксил-тРНК-синтазы многофункционального белка 2 (AIMP2), и микроРНК, способную контролировать экспрессию указанного сплайс-варианта AIMP2.

**[0141]** В качестве меры безопасности при пуске в торговый оборот, рекомбинантный вектор получали, как описано выше, чтобы вызвать специфическую экспрессию сплайс-варианта AIMP2 только в получивших инъекцию нервных тканях, и чтобы полностью блокировать возможность экспрессии AIMP2-DX2 в гематопоэтических клетках - основной популяции ненейрональных клеток в получившей инъекцию области ткани.

#### Пример 1.1. Получение варианта AIMP2.

**[0142]** AIMP2 является одним из белков, участвующих в образовании аминоксил-тРНК-синтетазы (ARS), и действует как мультифакториальный апоптотический белок. Для того чтобы сконструировать плазмиду, которая экспрессирует вариант, в котором экзон 2 AIMP2 был удален, кДНК сплайс-варианта AIMP2 клонировали в pcDNA3.1-мус. Субклонирование в pcDNA3.1-мус осуществляли с применением EcoR1 и Xho1 после амплификации сплайс-варианта AIMP2 с применением праймера, содержащего линкер EcoR1 и Xho1, присоединенный к кДНК H322.

**[0143]** Использовали вариант AIMP2, имеющий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 1 и последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2.

#### Пример 1.2. Сортировка микроРНК и выбор ее последовательности-мишени.

**[0144]** Выше упоминалось, что в качестве меры безопасности при пуске в торговый оборот, рекомбинантный вектор получали, как описано выше, чтобы ограничить экспрессию варианта AIMP2 получившими инъекцию нервными клетками и полностью блокировать возможность экспрессии AIMP2-DX2 в гематопоэтических клетках - основной популяции ненейрональных клеток в получившей инъекцию области ткани.

**[0145]** Для этой цели в качестве мишени выбирали miR-142-3p, которая специфически экспрессируется только в гематопоэтических клетках, которые образуют лейкоцитарные и лимфоидные родственные клетки. Для получения последовательности, на которую нацелена только miR-142-3p, использовали данные с микрочипов В-клеток мыши и



компьютерное моделирование генов, на которые нацелена miR-142-3p (балл mirSVR). MiR-142-3p представляет собой последовательность оснований, обозначенную номером последовательности 3. Последовательность, на которую нацелена miR-142-3p, обозначена номером последовательности 4, которая комплементарно связывается с miR-142-3p. Последовательность-мишень miR-142-3p может иметь последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5.

**[0146]** Последовательность-мишень miR-142-3p содержит сайт узнавания (ccagaagcttgctagc) ферментом рестрикции (Nhe I и Hind III, Bmt 1) и сайт узнавания (aagcttgtag) ферментом рестрикции (Hind H) для клонирования. Она содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5, которая была повторена 4 раза, причем повторы соединены линкерами (tcac и gatatc) (ФИГ. 3; SEQ ID NO: 6).

#### Пример 1.3. Получение рекомбинантного вектора.

**[0147]** Для получения рекомбинантного вектора последовательность-мишень miR-142-3p (SEQ ID NO: 5) вставляли в 3'-НТО варианта AIMP2 (номер последовательности 1). Соединение варианта AIMP-2 и последовательности-мишени miR-142-3p представлено как последовательность нуклеотидов под номером 6, и было осуществлено путем специфического разрезания и вставки в сайтах узнавания Nhe I и Hind III. Рекомбинантный вектор представлен на ФИГ. 1.

#### Пример 2. Подтверждение специфической для нервных клеток экспрессии рекомбинантного вектора.

Пример 2.1. Подтверждение эффекта нейрон-специфической экспрессии в условиях *in vitro*.

**[0148]** Поскольку miR142-3p специфически экспрессируется только гематopoэтических клетках, уровень экспрессии варианта AIMP2 был подтвержден в специфических клетках в соответствии с нокдауном варианта AIMP2 согласно экспрессии последовательности-мишени miR142-3p рекомбинантного вектора.

**[0149]** В частности, была группа без введения рекомбинантного вектора (ЛОЖНАЯ); группа с введением пустого/контрольного вектора (вектора отрицательного контроля (ОК)); группа с введением вектора варианта AIMP2 отдельно (pscAAV\_DX2) и группа с введением рекомбинантного вектора (pscAAV-DX2-miR142-3pT). Концентрация всех векторов представлена в единицах мкг/мкл, и каждой группе вводили 2,5 мкл (2,5 мкг). В каждой из групп введения осуществляли введение в клетки линии ТНР-1 (клетки

моноцитарного лейкоза человека) и клетки линии SH-SY5Y (нейробластомы) с подтверждением нокдауна варианта AIMP2. Количественную ПЦР осуществляли с применением праймеров, представленных ниже в Таблице 1 (денатурация в течение 15 секунд и отжиг и удлинение на протяжении 40 циклов по 30 секунд при температуре 60°C).

Таблица 1

Вариант AIMP2	Праймер	SEQ ID NO:
Прямой	CTGGCCACGTGCAGGATTACGGGG (только человеческий)	8
Обратный	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (только человеческий)	9

[0150] В результате подтвердили, что вариант AIMP2 не экспрессируется в ЛОЖНОЙ группе и группе вектора ОК. Кроме того, подтвердили, что осуществлялась экспрессия как в линии клеток ТНР-1, так и в линии клеток SH-SY5Y в группе с введением вектора варианта AIMP2 отдельно (pscAAV-DX2), что подтверждает отсутствие индукции специфической для нервных клеток экспрессии. С другой стороны, подтвердили, что вариант AIMP2 специфически экспрессировался только в линии клеток SH-SY5Y в группе с введением рекомбинантного вектора (ФИГ. 2).

Пример 2.2. Подтверждение эффекта специфической для нервных клеток экспрессии в условиях *in vivo*.

[0151] В частности, была группа с введением пустого/контрольного вектора (вектора ОК), группа с введением вектора варианта AIMP2 отдельно (pscAAV-DX2) и группа с введением рекомбинантного вектора в соответствии с настоящим изобретением (pscAAV-DX2-miR142-3pT). Осуществляли интрапаренхиматозное введение 10 мкл ( $10^9$  гв) каждого вируса в концентрации  $10^8$  гв/мкл. После интракраниальной инъекции мышам каждой из групп введения, подтверждали экспрессию AIMP2 в тканях толстого кишечника, тканях легких, тканях головного мозга, тканях печени, тканях почек, тканях тимуса, тканях селезенки и мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) через 1 неделю. Количественную ПЦР проводили с применением праймеров, представленных ниже в Таблице 1 (денатурация в течение 15 секунд и отжиг и удлинение на протяжении 40 циклов по 30 секунд при температуре 60°C).

[0152] В результате подтвердили, что экспрессия варианта AIMP2 специфически повышалась только в ткани головного мозга с высококонцентрированными нейронами в группе с введением рекомбинантного вектора в соответствии с настоящим изобретением (ФИГ. 3). С другой стороны, подтвердили, что экспрессия варианта AIMP2 затруднена в тканях, отличных от тканей головного мозга.

### Пример 3. Материалы и методы.

#### Пример 3.1. кРВ-ПЦР.

[0153] Общую РНК выделяли из спинного мозга с применением Тризола (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США), следуя протоколу производителя. Количество извлеченной РНК определяли с помощью спектрофотометра для количественного анализа (ASP-2680, ACTgene, США). Для получения кДНК осуществляли обратную транскрипцию с применением SuperScript III First-Strand (Invitrogen), следуя протоколу производителя. Полученную в результате этого кДНК использовали для ПЦР в реальном времени, применяя общую реакционную смесь SYBR green PCR master mix (ThermoFisher Scientific, США). Данные об экспрессии, полученные для двух повторов, использовали для статистического анализа 2- $\Delta\Delta C_t$ , и экспрессию GAPDH использовали для нормировки.

#### Пример 3.2. Животные.

[0154] Трансгенные мыши hSOD1 G93A (B6.Cg-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J), используемые в этом исследовании, были приобретены у Jackson Laboratories (Бар Харбор, Мэн, США). Также использовали контрольных мышей ДТ соответствующего возраста. Животных содержали в индивидуальных клетках в условиях без специфической патогенной микрофлоры и при постоянных условиях окружающей среды (температура 21 - 23 °C, влажность 50 - 60% и 12-часовой цикл света/темноты) в виварии Сеульского национального университета, Республика Корея. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с руководствами Институционального комитета по содержанию и использованию животных Сеульского национального университета (SNUACUC, 7 августа 2017 г.), и это исследование было одобрено местным этическим комитетом «SNUACUC» (№ одобрения: SNU-170807-1). На предсимптомной стадии, самкам мышей одного возраста вводили векторы AAV-GFP и DX2. Трансдукцию AAV-DX2 осуществляли путем интратекальной инъекции напрямую посредством люмбальной пункции. Всего 8 мкл (4 мкл/точку) вектора AAV-GFP или DX2 с помощью

шприца Гамильтон (Hamilton, Швейцария) медленно вводили путем инъекции (1 мкл/мин) в две точки при медленном извлечении иглы для предотвращения потери введенного вектора (Hamilton, Швейцария).

Пример 3.3. Эксперимент по опосредованному miR142-3p ингибированию.

**[0155]** Ингибирующее действие miR-142-3p на экспрессию DX2 можно было наблюдать для x1 последовательности-мишени miR-142-3p. Осуществляли временную трансфекцию клеток НЕК293 векторами с x1, x2 и x3 повторами последовательности-мишени miR-142-3p, а также 100 пмоль miR-142-3p с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 часов. Количество мРНК DX2 анализировали с помощью ПЦР. Опосредованное miR142-3p ингибирование экспрессии DX2 наблюдали для x1 повтора Tseq последовательности-мишени miR142-3p (ФИГ. 5B).

Пример 4.

Пример 4.1. Получали три типа векторов для осуществления эффекта ингибирования коровой последовательности для связывания.

**[0156]** Tseq x1 содержит 1 коровую последовательность для связывания, Tseq x2 содержит 2 коровые последовательности для связывания и Tseq x3 содержит 3 коровые последовательности для связывания (ФИГ. 5A).

**[0157]** Ингибирование посредством miR142-3p (100 пмоль) экспрессии DX2 начали наблюдать уже для x1 повтора последовательности-мишени miR142-3p. Осуществляли временную трансфекцию клеток НЕК293 векторами с x1, x2 и x3 повторами Tseq miR-142-3p, а также 100 пмоль miR-142-3p, применяя липофектамин 2000 (Invitrogen, США), затем инкубировали в течение 48 ч. Количество мРНК DX2 анализировали с помощью ПЦР. При увеличении количества коровых последовательностей для связывания в последовательности-мишени miR142-3p, также повышалось ингибирование посредством miR142-3p экспрессии DX2. Для вектора, содержащего Tseq x3 в последовательности-мишени, выявили значительное ингибирование (ФИГ. 5B).

Пример 4.2. Мутирование коровой последовательности.

**[0158]** Используя данные с микрочипов В-клеток мыши и балл mirSVR гена-мишени miR-142-3p, предсказали коровую последовательность. Четыре области коровых последовательностей заменили следующим образом: (5'-AACACTAC-3' → 5'-

ССАСТGСА-3') (см. исходную последовательность на ФИГ. 4 и схематический рисунок на ФИГ. 5А).

Пример 4.3. Коровая последовательность для связывания важна для ингибирования DX2. [0159] Четыре коровые последовательности были заменены (ФИГ. 5А). Осуществляли временную трансфекцию клеток НЕК293 вектором DX2-miR-142-3р с x3 повторами Tseq (Tseq3x) или вектором с мутированной коровой последовательностью (mut), и 100 пмоль miR-142-3р, применяя липофектамин 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 ч. Экспрессию мРНК DX2 анализировали с помощью ПЦР. Вектор с x3 повторами Tseq, для которого показали значительное ингибирование DX2 (ФИГ. 5В), и конструкцию DX2 использовали в качестве контроля. Введение 100 пмоль miR142-3р значительно ингибировало вектор Tseq x3, но DX2 и мутированная последовательность не ингибировались (ФИГ. 6).

Пример 4.4. Результаты распределения в ткани в модели БАС у мышей.

[0160] Общую РНК выделяли из спинного мозга после интратекальной инъекции scAAV2-DX2-miR142-3р. Проводили кРВ-ПЦР. Экспрессия DX2 должна быть ограничена только местом инъекции - спинным мозгом. Мыши, трансгенные по hSOD1 G93A, экспрессировали scAAV-DX2 miR142-3р после интратекальной инъекции. При инъекции контрольного носителя выявили экспрессию только в спинном мозге, но не в головном мозге и не в седалищном нерве (ФИГ. 7).

Пример 5.

[0161] В Примере 2 клетки НЕК293Т котрансфицировали тремя плазмидами от Oxgene, Великобритания, которые кодируют все компоненты, необходимые для получения рекомбинантных частиц AAV2.

[0162] Клетки НЕК293Т также трансфицировали только рSF-AAV-ITR-CMV-EGFP-ITR-KanR (Oxgene, Великобритания) со вставкой AIMP2-DX2 или DX2-последовательности-мишени miR142 в виде векторов экспрессии, а не для продукции частиц AAV.

[0163] Кодированным DX2 вектором (2 мкг) и кодирующим DX2-последовательность-мишень miR142 вектором (2 мкг) трансфицировали клетки THP-1 (моноциты человека, CD45+ клетки) и SH-SY5Y (нервные клетки). Через 48 ч клетки собирали и выделяли мРНК. По синтезированной кДНК анализировали экспрессию DX2 с помощью ПЦР в реальном времени.

**[0164]** Тогда как уровень экспрессии DX2 в SH-SY5Y, трансфицированных кодирующим DX2 вектором и кодирующим DX2-последовательность-мишень miR142 вектором, был аналогичным, экспрессия DX2 в клетках ТНР-1, трансфицированных кодирующим DX2-последовательность-мишень miR142 вектором, была сильно снижена. Таким образом, miR142-3р работала только в клетках ТНР-1 (ФИГ. 8).

Пример 6.

Пример 6.1. Экспериментальные методы.

**[0165]** Модели на животных.

**[0166]** Трансгенных мышей hSOD1<sup>G93A</sup> (B6.Cg-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J), используемых в данном исследовании, приобретали в the Jackson Laboratories (Бар Харбор, Мэн, США). Животных содержали в индивидуальных клетках в условиях без специфической патогенной микрофлоры и при постоянных условиях окружающей среды (температура 21 - 23 °С, влажность 50 - 60% и 12-часовой цикл света/темноты). На предсимптомной стадии, самкам мышей одного возраста вводили векторы AAV2-GFP или AAV2-DX2. Трансдукцию AAV2-DX2 осуществляли путем интратекальной инъекции напрямую посредством люмбальной пункции. Всего 8 мкл (4 мкл/точку) вектора AAV-GFP или DX2 с помощью шприца Гамильтон (Hamilton, Швейцария) медленно вводили путем инъекции (1 мкл/мин) в две точки при медленном извлечении иглы для предотвращения потери введенного путем инъекции вируса.

**[0167]** Анализ поведения. Для того чтобы определить начало заболевания, отметили день, когда мыши начали терять массу тела до 5 - 6% от максимальной массы тела. Известно, что обычно стадии с тяжелыми симптомами наблюдаются с 12 недели после рождения мышей SOD1G93A, но нарушения двигательной активности начинаются за несколько недель до проявления явных симптомов (45 день после рождения) (C. R. Hayworth et al. *Neuroscience*. 2009 December 15; 164(3): 975–985). В настоящем исследовании, через 9 недель после рождения, когда наблюдали прихрамывание, и мыши начали терять до 5 - 6% от их максимальной массы тела, самкам мышей одного возраста вводили scAAV-GFP или scAAV-DX2 (GO102). Трансдукцию AAV2-DX2 (GO102) осуществляли путем интратекальной инъекции напрямую с помощью поясничной пункции.

Пример 6.2. Результаты.

[0168] На ФИГ. 9А - 9С показано, что среди мышей, которым вводили ротенон, у трансгенных по DX2 мышей улучшались двигательные симптомы. На ФИГ. 9А показан анализ экспрессии TH в головном мозге указанных мышей. Черный пунктирный четырехугольник показывает TF-окрашенные области. На ФИГ. 9В показан тест на вращающемся стержне. Продолжительность периода до падения у получивших ротенон мышей дикого типа и трансгенных (TG) по DX2 мышей. На ФИГ. 9С показан тест на шесте. Вертикальное перемещение (левая панель) и время разворота (правая панель) у получивших ротенон мышей дикого типа и TG по DX2 мышей. Животные:  $n = 6$  (в каждой группе),  $n/3$ : незначимо,  $**P < 0,01$ ,  $*P < 0,05$ , t-критерий. На ФИГ. 9D и 9E показано, что DX2 улучшает симптомы нейронального повреждения и поведение в модели вызванной ротеноном БП у мышей. На ФИГ. 9D показан тест на шесте. scAAV-DX2 восстановил координацию движений и равновесие в модели вызванной введением ротенона БП у мышей. «Контр» и «GFP» обозначают мышей дикого типа и получивших ротенон мышей, которым осуществляли инъекцию GFP. «Доза 1» и «Доза 2» представляют собой различные дозы инъекции DX2 мышам, получившим ротенон. На ФИГ. 9E показаны изображения иммуногистохимии и иммунофлуоресценции черного вещества мыши. На верхней панели показаны TH-положительные клетки в стриатуме, а на нижней панели представлено распределение введенного путем инъекции экспрессирующего GFP вируса. Черный пунктирный четырехугольник указывает на окрашенную TH область. Животные:  $n = 5$  (в каждой группе),  $n/3$ : незначимо,  $**P < 0,05$ ,  $*P < 0,01$ , t-критерий.

[0169] На ФИГ. 10А - 10Н показано, что DX2 предотвращает расстройство поведения в модели вызванной 6-ГДА БП. На ФИГ. 10А продемонстрировано, что у мыши, которой вводили scAAV-DX2, выявили более низкие уровни контрлатерального вращения по сравнению с таковыми у мышей, получивших физиологический раствор или носитель (GFP), что свидетельствует о том, что DX2 уменьшал повреждение дофаминергических нейронов. На ФИГ. 10В продемонстрировано, что у мышей, которым вводили DX2, выявили увеличение количества касаний противоположной передней лапой, что свидетельствует о том, что AAV-DX2 уменьшал одностороннее повреждение дофаминергических нейронов. На ФИГ. 10С продемонстрировано, что у мыши, которой вводили AAV-DX2, выявили меньшее доминирование правосторонних поворотов тела. Животные: физиологический раствор (мыши дикого типа, которым вводили физиологический раствор)  $n = 4$ , GFP (мыши, которым инъекцировали GFP и вводили 6-ГДА)  $n = 5$ , DX2 (мыши, которым инъекцировали DX2 и вводили 6-ГДА)  $n = 11$ , scAAV:

scAAV-GFP  $4 \times 10^9$  гв, scAAV-DX2  $4 \times 10^9$  гв, н/з: незначимо,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,005$ ,  $***P < 0,001$ , t-критерий. На ФИГ. 10D показано иммунофлуоресцентное изображение головного мозга мышей, в который вводили путем инъекции GFP и DX2. Белый четырехугольник указывает на TH-положительные дофаминергические нервные клетки, а белые стрелки указывают на место инъекции вируса. На ФИГ. 10E показан уровень выживаемости в каждой группе мышей. Животные:  $n = 15$ , «Физиологический раствор» обозначает мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор. «L-ДОФА», «GFP» и «DX2» обозначают инъекцию L-ДОФА, GFP и DX2 мышам, которым вводили 6-ГДА. scAAV: scAAV-GFP (GFP)  $4 \times 10^9$  гв, scAAV-DX2 (DX2) (низкий)  $1,6 \times 10^8$  гв, scAAV-DX2 (DX2) (высокий)  $4 \times 10^9$  гв. На ФИГ. 10F и 10G показана экспрессия мРНК DX2 и Вах у исходных мышей и мышей, которым вводили 6-ГДА и DX2.  $***P < 0,001$ , t-критерий. На ФИГ. 10H показана гибридизация РНК *in situ* для идентификации экспрессирующих DX2 клеток в созданной с помощью 6-ГДА модели на мышах, которым вводили путем инъекции AAV-DX2.

[0170] ФИГ. 11A - 11G показано, что DX2 снимает двигательные симптомы в модели вызванной МФТП БП. На ФИГ. 11A продемонстрировано, что у мыши, которой вводили scAAV-DX2, выявили немного большую продолжительность периода до падения в тесте на вращающемся стержне по сравнению с таковой, которой вводили носитель (scAAV-GFP, GFP), что свидетельствует о том, что scAAV-DX2 уменьшал повреждение дофаминергических нейронов. На ФИГ. 11B продемонстрировано, что у мыши, которую лечили DX2, выявили улучшенную локомоторную активность на основании протокола SHIRPA. На ФИГ. 11C продемонстрировано, что у мышей, которым вводили DX2, выявили относительно более низкий уровень нарушения со стороны конечностей. На ФИГ. 11D продемонстрировано, что у мыши со сверхэкспрессией DX2 выявили улучшенный уровень груминга по сравнению с контрольной, которой вводили носитель (GFP). На ФИГ. 11E показано иммунофлуоресцентное изображение TH-положительных клеток в черном веществе мышей. Белый четырехугольник указывает на экспрессирующие TH области. На ФИГ. 11F и 11G показана экспрессия мРНК DX2 (ФИГ. 11F) и Вах (ФИГ. 11G) в головном мозге указанных мышей. «Исходные», «GFP» и «DX2» обозначают мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор, мышей, которым инъецировали GFP и вводили МФТП, и мышей, которым инъецировали DX2 и вводили МФТП. Животные: исходные  $n = 6$ , GFP  $n = 9$ , DX2  $n = 12$ , scAAV: scAAV-GFP  $4 \times 10^9$  гв, scAAV-DX2  $4 \times 10^9$  гв,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,001$ ,  $***P < 0,0001$ , t-критерий.



Пример 7.

[0171] Трансгенным по SOD1 мышам вводили AAV-GFP (GFP) или AAV-DX2 в спинномозговой канал, чтобы исследовать действия DX2 *in vivo*. Начало заболевания было отсрочено в группе мышей, которым вводили путем инъекции DX2, по сравнению с группой мышей, которым вводили путем инъекции GFP. Более того, мыши в группе, которой вводили DX2, выживали значительно дольше, чем мыши в группе, которой вводили путем инъекции GFP. Продолжительность жизни мышей, которым вводили DX2, была больше по сравнению с мышами, которым вводили путем инъекции GFP.

[0172] На ФИГ. 12А и 12В показано, что введение DX2 улучшало начало заболевания и увеличивало продолжительность жизни мышей в модели болезни Лу Герига. ФИГ. 12А. Начало заболевания было улучшено в группе AAV-DX2. ФИГ. 12В. Продолжительность жизни мышей была увеличена в группе AAV-DX2 по сравнению с группой AAV-GFP. Животные: n = 5.

Пример 8.

Пример 8.1. Экспериментальные методы.

[0173] Культура клеток и обработка.

[0174] Клетки SK-SY5Y, линии клеток нейробластомы человека, поддерживали в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Для индукции болезни Альцгеймера (БА) в нервных клетках, клетки SK-SY5Y высевали в 6-луночные планшеты при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/луночку, и через 16 часов культуральные среды заменяли на RPMI 1640, содержащую 25 мкМ олигомера белка  $\beta$ -амилоида ( $\beta$ -О), на 24 часа. Для того чтобы определить ингибиторное действие экспрессии DX2 на гибель нервных клеток, клетки SK-SY5Y инкубировали с  $\beta$ -О в течение 24 часов, а затем использовали носитель (scAAV2-GFP) или сверхэкспрессирующий DX2 (scAAV2-DX2) вирус для обработки клеток в течение 48 часов в ростовой среде RPMI 1640. Гибель клеток анализировали с помощью вестерн-блоттинга и микроскопии.

[0175] Анализ методом иммуноблоттинга.

[0176] Клетки SH-SY5Y лизировали в 25 мМ Трис-НСl, рН 7,4, содержащем 150 мМ NaCl, 0,5% Тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеаз. Проводили блоттинг образцов, содержащих 50 мкг белка, путем электропереноса с 10% полиакриламидного геля на мембрану. Мембрану блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в трис-буферном физиологическом растворе с 20% Твин-20 и инкубировали с первичными

антителами против p53 и актина. Антитела на мембране детектировали вторичными антителами мыши против антител козы и антител кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена. Мембрану анализировали с помощью субстрата Supersignal West Dura Duration Substrate, следуя инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Пример 8.2. Результаты.

**[0177]** AIMP2-DX2 уменьшает вызванную A $\beta$ -O гибель нервных клеток.

**[0178]** Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое вызывается накоплением в мозге аномального белка, такого как белок  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ ) и фосфорилированный белок тау (p-tau) (Duyskaerts 2009). Известно, что агрегация белка  $\beta$ -амилоида путем протеолитического расщепления белка-предшественника амилоида играет решающую роль в развитии БА (Viola 2015 и De Strooper 2010). Таким образом, авторы настоящего изобретения исследовали, может ли сверхэкспрессия AIMP2-DX2 (DX2), ингибирующего фактора гибели клеток (Choi 2011), в клетках, индуцированных к БА, влиять на гибель нервных клеток. На ФИГ. 13 выживаемость клеток не отличалась среди необработанных, обработанных носителем (AAV-GFP) и обработанных DX2 (AAV-DX2) клеток при нормальном росте, позволяя предположить, что повышенная экспрессия DX2 в нормальных условиях не является причиной выживаемости нервных клеток. В условии обработки A $\beta$ -O наблюдали снижение гибели нервных клеток среди клеток, которые обрабатывали DX2 (A $\beta$  + AAV-DX2), по сравнению с клетками, обработанными носителем (A $\beta$  + AAV-GFP). Провели количественный анализ гибели нервных клеток, представленный на ФИГ. 14, и вычисляли процент клеток после визуального анализа клеток в трех различных полях зрения на ФИГ. 13. На ФИГ. 14 показано, что нервные клетки с повышенной экспрессией DX2 обладали значительно большей жизнеспособностью по сравнению с группой, обработанной носителем (до 47%). Эти результаты указывают на то, что экспрессия DX2 является важным фактором для защитного эффекта от вызванной A $\beta$ -O гибели клеток.

**[0179]** DX2 ингибирует вызванную A $\beta$ -O экспрессию p53.

**[0180]** P53, белок-супрессор опухоли, представляет собой ключевой фактор, который регулирует такие биологические события как клеточный цикл и апоптоз (Finlay 1989). В предыдущих сообщениях (Choi 2011) показали, что AIMP2 связывается с N-концом p53, который является связывающим доменом для Mdm2, и его связывание вызывает

стабильность p53 и проапоптотическую активность. Также, известно, что DX2 ингибирует апоптотическую активность AIMP2, нарушая взаимодействие с p53. Таким образом, исследовали, влияет ли повышенная экспрессия DX2 в результате вирусной трансдукции гена DX2 на экспрессию p53 в обработанных Aβ-O нервных клетках. На ФИГ. 15 показано, что уровень экспрессии p53 в клетках не изменялся в условиях нормального роста, но уровень экспрессии p53 повышался в присутствии Aβ-O. Также, в клетках, обработанных DX2, экспрессия DX2 снижала вызванную Aβ-O экспрессию p53. Эти результаты позволяют предположить, что DX2 ингибирует вызванный Aβ-O апоптоз и экспрессию проапоптотического белка, такого как p53, в нервных клетках.

**[0181]** Экспрессия DX2 играет важную роль в вызванной нейротоксином экспрессии p53 (ФИГ. 15). Клетки SK-SY5Y инкубировали с AAV-DX2 или AAV-GFP в отсутствие или в присутствии 25 мкМ Aβ-O. Через 48 часов получали лизаты общего белка и анализировали уровень белка p53 с помощью иммуноблоттинга. Уровень β-актина анализировали в качестве контроля загрузки. Красным четырехугольником отмечен повышенный уровень p53 в обработанных Aβ-O клетках.

Пример 9.

Пример 9.1. Материалы и методы.

**[0182]** Культура клеток и реагент.

**[0183]** Линию клеток НЕК 293 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния, США), и клетки Neuro-2A (N2A), SK-N-SH и SH-SY5Y получали из Корейского банка линий клеток (KCLB, Сеул, КОРЕЯ). Клетки НЕК 293 и клетки N2A растили в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина-стрептомицина (HyClone, Питтсбург, Пенсильвания, США). Клетки SK-N-SH инкубировали в RPMI-1640 с 10% FBS и 1% антибиотиками. Временную трансфекцию тус-меченого KARS, HA-меченого мутантного SOD1, GFP-меченого KARS и GFP-меченого мутантного SOD1 осуществляли с помощью липофектамина 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT) и НЕМА (2-гидроксиэтилметакрилат) были получены от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

**[0184]** Дрожжевой двугибридный анализ.

**[0185]** Полноразмерный KARS и фрагментированный KARS клонировали в плазмиду pLexA, и SOD1 ДТ, SOD1 G85R и SOD1 G93A клонировали в плазмиду pB42. Положительное взаимодействие между LexA-фрагментами KARS и B42-SOD

ДТ/SOD85/SOD93 в дрожжах определяли с помощью репортерной системы *LEU2* и *LacZ* с применением планшета с X-gal (21).

**[0186]** Анализ иммунопреципитации.

**[0187]** Лизаты клеток собирали и подготавливали с помощью буфера RIPA (50 мМ Трис-НСl рН 8,0, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 20% глицерин, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия и PMSF). Лизаты клеток инкубировали в течение 30 минут на льду с последующим сбором супернатанта после центрифугирования в течение 10 минут при 12000 g. Агарозные гранулы против HA или против Muc добавляли к лизатам и инкубировали в течение ночи при 4 градусах на качающейся платформе. Белки, связанные с агарозными гранулами, промывали три раза, и собранные образцы разделяли с помощью электрофореза в ПААГ/ДСН и проводили анализ методом вестерн-блоттинга.

**[0188]** Вестерн-блоттинг и антитела.

**[0189]** Клетки лизировали в 25 мМ Трис-НСl, рН 7,4 содержащем 150 мМ NaCl, 0,5% Тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеаз. Проводили блоттинг образцов, содержащих 50 мкг белка, путем электропереноса с 10% полиакриламидного геля на мембрану. Мембрану блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в трис-буферном физиологическом растворе с 20% Твин-20 и инкубировали с первичными антителами против Muc (Santa Cruz biotechnology, sc-40), HA, GFP, 67 кДа рецептора ламинина, IκB, тубулина, β-актина, TRAF2, EPRS, KARS, AIMP2, Erk, фосфорилированного Erk. Антитела на мембране детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена вторичных антител мыши против антител козы и против антител кролика. Мембрану анализировали с помощью субстрата Supersignal West Dura Duration Substrate, следуя инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

**[0190]** Иммуноцитохимия.

**[0191]** Клетки фиксировали с помощью 4% параформальдегида (ПФА) при комнатной температуре в течение 10 мин с последующей промывкой в ФБР и инкубировали в течение ночи с антителами против SOD1, 67LR. Окрашенные клетки промывали, а затем инкубировали с меченым Alexa Fluor IgG (Vector Laboratories INC, Берлингейм, Калифорния, США). Ядерную ДНК окрашивали DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндо, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

**[0192]** Анализ миграции клеток.

**[0193]** Анализ миграции проводили, применяя камеру Transwell с порами 8 мкм (Corning INC, Корнинг, Нью-Йорк, США). Клетки N2A в бессывороточной среде высевали в

верхнюю камеру 24-луночного планшета для анализа миграции. Нижнюю камеру заполняли 400 мкл DMEM с 10% FBS. Через 24 часа верхнюю камеру фиксировали с помощью 10% ПФА в течение 10 мин при комнатной температуре с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым. Затем подсчитывали мигрировавшие клетки.

**[0194]** Анализ жизнеспособности клеток.

**[0195]** Для анализа МТТ  $5 \times 10^4$  клеток/лунку высевали в 96-луночный планшет и обрабатывали в течение 24 ч указанной молекулой. После соответствующей инкубации в каждую лунку добавляли 15 мкл 5 мг/мл раствора МТТ в ФБР (рН 7,2) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Раствор удаляли и в каждую лунку добавляли диметилсульфоксид (ДМСО), чтобы растворить нерастворимый осадок формазана, и измеряли поглощение на 620 нм с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов.

**[0196]** Субклеточное фракционирование.

**[0197]** Для определения клеточной локализации KARS1 цитозольные и мембранные фракции собирали, применяя набор для субклеточного фракционирования (Biovision, Milpitas, Калифорния, США). Вкратце, клетки лизировали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при 4°C, и супернатант использовали в качестве цитозольной фракции. Затем осадки промывали и инкубировали с буфером с дезоксихолатом натрия при 4°C в течение 10 мин и использовали в качестве мембранной фракции.

**[0198]** Анализ силы прикрепления клеток.

**[0199]** Клетки SH-SY5Y, трансфицированные SOD1 G93A и DX2, высевали ( $1,0 \times 10^4$  клеток/мл) в 96-луночный планшет E-Plate (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США) и обрабатывали TNF- $\alpha$  в течение 24 ч для скрининга адгезии клеток. Затем прикрепленные клетки подсчитывали с помощью iCELLigence (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США).

Пример 9.2. Результаты.

**[0200]** Ранее сообщалось, что митохондриальная форма KARS взаимодействовала с мутантными формами SOD1, и мутантные SOD1 и митоKARS приводили к морфологическим аномалиям митохондрий и токсичности для клеток. Следовательно, для того чтобы исследовать, может ли KARS регулировать гибель нервных клеток с

мутациями SOD1, авторы настоящего изобретения сначала подтвердили эффективность связывания мутантного SOD1 и KARS. Для этих экспериментов получали SOD1 ДТ, SOD1 G93A, SOD1 G85R и KARS и анализировали взаимодействие KARS с каждым из SOD1 с помощью дрожжевого двугибридного анализа (ФИГ. 16А) и анализа иммунопреципитации (ФИГ. 16В), и наблюдали, что KARS связывается с мутантным SOD1 с гораздо большей силой связывания, чем с SOD1 ДТ (ФИГ. 16А и 16В).

**[0201]** Затем для исследования сайта специфического связывания KARS и мутантного SOD1, авторы настоящего изобретения подтвердили взаимодействие укороченного KARS и мутантного SOD1 с применением анализа с помощью дрожжевой двугибридной системы. На ФИГ. 16С показано, что наблюдали связывание мутантного SOD1 с N-концом KARS. Показали, что AIMP2 и 67 кДа рецептор ламинина взаимодействуют с N-концом KARS для миграции раковых клеток и регуляции выживаемости клеток. Поскольку AIMP2, 67 LR и мутантный SOD1 связываются с N-концом KARS, авторы настоящего изобретения исследовали, влияет ли взаимодействие KARS и мутантного SOD1 на связывание KARS с AIMP2 и 67LR. На ФИГ. 16D показано, что AIMP2 и 67LR связывали KARS в присутствии SOD1 ДТ, тем не менее, наблюдали снижение связывания KARS с AIMP2 и 67LR в присутствии мутантного SOD1. Результаты показали, что мутантный SOD1 снижает связывание KARS с AIMP2 и 67LR путем конкуренции за связывание с N-концом KARS.

**[0202]** Поскольку авторы настоящего изобретения выявили, что мутантный SOD1 G93A лучше всего связывается с KARS, захотели исследовать его влияние на 67LR и выяснить, коррелировало ли оно с гибелью нервных клеток. При трансфекции мутантным SOD1 клеток SK-N-SH обнаружили, что уровень 67LR был снижен (ФИГ. 17А).

**[0203]** Для подтверждения локализации экспрессии 67LR проводили ИФ (иммунофлуоресцентный) анализ в мутантных трансфицированных SOD1 клетках. Было показано, что уровень KARS выше в цитоплазме, чем в мембране, и сильно снижался в мембранной области (ФИГ. 17В).

**[0204]** Ранее было показано, что KARS вызывал миграцию клеток посредством 67LR. Когда клетки трансфицировали SOD1 дикого типа или мутантным SOD1, миграция клеток подавлялась мутантным SOD1 по сравнению с SOD1 дикого типа (ФИГ. 17С).

**[0205]** Поскольку мутантный SOD1 оказывает влияние на экспрессию 67LR, авторы настоящего изобретения исследовали его влияние на сигнальный путь ламинина и смогли подтвердить, что мутантный SOD1 сильно снижает активность pERK (ФИГ. 17D).

[0206] Также исследовали, влияет ли экспрессия мутантного SOD1 на аффинность связывания между KARS и 67LR. На ФИГ. 17Е видно снижение взаимодействия с KARS и 67LR при экспрессии мутантного SOD1.

[0207] Аноиксис представляет собой вид апоптоза, который запускается утрачиванием контакта между внеклеточным матриксом (ВКМ) и белками клеточной мембраны, и устойчивость к аноиксису играет важную роль в выживаемости клеток. Для индукции аноиксиса клетки котрансфицировали мутантным SOD1 и KARS и инкубировали с TNF-альфа/CHX или без в условиях суспензии. В результате наблюдали, что гибель клеток не снижалась при сверхэкспрессии KARS (ФИГ. 17F). Этот результат позволяет предположить, что регуляция гибели клеток рецепторами ламинина обусловлена повышением последующей передачи сигналов от взаимодействия рецептора ламинина и ВКМ.

[0208] Авторы настоящего изобретения исследовали, играет ли DX2 важную роль в вызванной мутантным SOD1 экспрессии 67 LR. Клетки SK-N-SH трансфицировали генами SOD1 ДТ и мутантного SOD1 G93A, а затем одну группу трансфицировали проапоптотическими генами AIMP2, а другую группу - антиапоптотическими генами DX2. Наблюдали, что в присутствии DX2 снижение уровня белка 67LR путем сверхэкспрессии AIMP2 восстанавливалось (ФИГ. 18А).

[0209] Затем подтвердили, что экспрессия 67LR, сниженная в плазматической мембране мутантным SOD1, была восстановлена геном DX2. Сверхэкспрессия DX2 в клетках, экспрессирующих мутантный SOD1, повышала уровень белка 67LR в мембране клетки (ФИГ. 18В), а также наблюдали, что последующая передача сигналов от 67LR восстанавливалась при введении гена DX2 (ФИГ. 18С).

[0210] Затем исследовали открепление клеток после обработки TNF- $\alpha$  с последующей трансфекцией ПВ, мутантным SOD1 и мутантным SOD1+DX2. Обработка DX2 предотвращала открепление клеток и аноиксис (ФИГ. 18D).

[0211] Подтвердили действие DX2 на гибель нервных клеток, вызванную мутантным SOD1. Когда AAV-DX2 трансдуцировали клетки с повышенной экспрессией SOD1 ДТ или мутантного SOD1, то наблюдали, что апоптоз, вызванный мутантным SOD1, снизился до контрольного уровня (ФИГ. 19А). Уровень гибели клеток с SOD1 ДТ и двумя мутантными SOD1 G85R и G93A, вызванный обработкой CHX/TNF- $\alpha$ , повышался в инфицированных GFP клетках приблизительно на 20%, соответственно. Тем не менее, уровень гибели клеток, вызванный обработкой CHX/TNF- $\alpha$ , среди инфицированных

DX2 клеток был приблизительно на 20% ниже, чем уровень гибели клеток среди трансдуцированных GFP клеток, причем различие было значимым ( $p < 0,001$ ).

**[0212]** Снижение вызванной CHX/TNF- $\alpha$  гибели клеток благодаря сверхэкспрессии DX2 также было показано в первичном нейроне. Первичные нервные клетки, выделенные из мышечной дикого типа или трансгенных по SOD1 мышечной, инфицировали AAV для сверхэкспрессии DX2, трансфицированные клетки обрабатывали CHX/TNF- $\alpha$  и анализировали уровень гибели клеток. Показали, что среди первичных нервных клеток с SOD1 G93A наблюдали повышенную гибель клеток в условиях обработки CHX/TNF- $\alpha$ , тогда как DX2 сильно снижал гибель клеток среди обработанных CHX/TNF- $\alpha$  первичных нервных клеток с SOD1 ДТ и G93A (ФИГ. 19B).

Пример 10.

**[0213]** В предыдущем исследовании было показано, что AIMP2 действует как субстрат паркина и взаимодействует с PARP-1, и это взаимодействие регулирует гибель нервных клеток при БП (Lee 2013). Таким образом, для того чтобы исследовать, является ли DX2 конкурентным ингибитором AIMP2 и регулирует ли гибель нервных клеток, сначала провели анализ связывания между PARP-1 и AIMP2 или DX2. Экспрессия PARP-1, AIMP2 и DX2 была вызвана трансфекцией каждой из плазмид клеток SH-SY5Y с последующим анализом методом копреципитации PARP-1 (ФИГ. 20A). Клетки трансфицировали ПВ (пустым вектором), AIMP2 и DX2, и через 24 часа трансфицированные клетки инкубировали с 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 4 часов. Уровни расщепленного PARP-1 (ФИГ. 20B) и ПАРилирования (ФИГ. 20C) исследовали, применяя анализ методом иммуноблоттинга. В условиях вызванного окислительным стрессом повреждения клеток, DX2 снижает расщепление PARP-1 (ФИГ. 20B) и ПАРилирование (ФИГ. 20C), связанные с гибелью клеток.

**[0214]** На ФИГ. 20A показано, что обнаружили, что DX2 связывается с PARP-1 сильнее, чем AIMP2. Для того чтобы оценить, могут ли AIMP2 и DX2 влиять на расщепление PARP-1 в условиях окислительного стресса, авторы настоящего изобретения осуществляли трансфекцию клеток вектором, экспрессирующим пустой контроль (ПВ), AIMP2 или DX2, с последующей обработкой перекисью водорода. В трансфицированных AIMP2 клетках выявили значимо повышенное расщепление PARP-1 по сравнению с экспрессией, наблюдаемой в других трансфицированных клетках, в условиях окислительного стресса. Тем не менее, расщепление PARP-1 не наблюдали в трансфицированных DX2 клетках (ФИГ. 20B).



[0215] ПАРилирование представляет собой посттрансляционный процесс, который регулирует такие биологические события как ответ на повреждение ДНК и апоптоз (Szabo 1996 и Virag (1998)). PARP-1 представляет собой фермент, который распознает поврежденную ДНК в ядре, образует цепи PAR и вызывает деградацию поврежденных белков посредством парилирования. Поскольку ПАРилирование, т.е., образование полимеров PAR, требует каталитической активности расщепленного PARP-1 (Barkaускаite 2015), исследовали влияние AIMP2 или DX2 на ПАРилирование. На ФИГ. 20С показано, что ПАРилирование AIMP2 повышалось в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, но ПАРилирование DX2 не изменялось. На основании данных результатов пришли к выводу, что DX2 представляет собой молекулу, ингибирующую вызванное окислительным стрессом расщепление PARP-1.

[0216] Пример 11.

[0217] Ингибирование посредством DX2 повреждения нейромышечного синапса.

[0218] Двигательные нейроны необходимы для обмена информацией между головным мозгом и мышцами и передают необходимые инструкции для подвижности. Когда эти нервные клетки плохо функционируют или повреждены, они постепенно перестают обмениваться информацией с мышцами, и головной мозг утрачивает способность контролировать и инициировать сознательные движения. Это приводит к прогрессирующей слабости, мышечным судорогам (фасцикуляциям) и атрофии произвольно сокращающихся скелетных мышц по всему телу. Кроме того, считают, что дегенерация НМС, приводящая к денервации скелетных мышц, играет важную роль в возникновении БАС. Мышечная судорога/фасцикуляция и дыхательная недостаточность обычно происходят при БАС в течение 2 – 3 лет с момента начала заболевания. На последних стадиях заболевания это приводит к фатальному параличу и смерти вследствие дыхательной недостаточности.

[0219] Мышцы фиксировали в 4% ПФА в течение ночи при 4°С. Мышцы обезвоживали в 30% сахарозе и заключали в среду ОСТ для получения криосрезов ткани. Делали криосрезы всех образцов мышц из нейромышечного синапса при толщине среза 20 мкм.

[0220] Криосрезы толщиной 20 мкм промывали дважды (каждый раз по 5 мин) в 1X ФБР, затем инкубировали в блокирующем растворе (5% БСА) в течение 1 ч при комнатной температуре.

[0221] БСА удаляли и инкубировали срезы в течение ночи с первичными антителами против нейрофиламентов (окрашивание зеленым цветом с применением антител против нейрофиламента и антител против 2H3, SV2) и против постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов (AChR) (окрашивание красным цветом с применением конъюгатов  $\alpha$ -бунгаротоксина с флуоресцентным красителем) в блокирующем растворе при комнатной температуре. Можно было легко наблюдать множество дефектов, включая частично иннервированные или полностью денервированные области постсинаптических рецепторов, фрагментированные или уменьшившиеся постсинаптические рецепторы, атрофированные аксоны или нервные окончания и набухшие или дистрофические аксоны или нервные окончания.

[0222] Устанавливали области особого интереса иммунофлуоресценции и измерения коэффициента перекрытия измеряли с помощью Image J.

[0223] На этом основании измеряли денервацию скелетных мышц в каждой из групп дикого типа (ДТ), модели вызванного БАС (AAV-GFP) и модели вызванного БАС (GO102) путем двойного окрашивания икроножных мышц на альфа-бунгаротоксин и SV2, 2H3.

[0224] На ФИГ. 22А показано, что нейромышечные синапсы окрашивали альфа-бунгаротоксином, а синаптические везикулы и концевую пластинку окрашивали SV2 и 2H3. На ФИГ. 22В представлено подсчитанное количество иннервированных концевых пластинок.

[0225] GO102 снижал выраженность уменьшения % иннервированных концевых пластинок ( $75,6 \pm 12,6$  по сравнению с  $41,0 \pm 2,03\%$ ), наблюдаемого в модели заболевания БАС.

[0226] В совокупности, DX2 ингибирует повреждение нейромышечного синапса (НМС), и ожидают, что DX2 восстанавливает вызванную блокированием НМС дыхательную недостаточность и мышечные судороги или фасцикуляцию.

#### [0227] ССЫЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

KR 10-1067816 (2011).

Rosen DR, *et al.* (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362(6415):59-62.

Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.

Fridovich I (1997) Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272(30):18515-18517.

Bruijn LI, *et al.* (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281(5384):1851-1854.

Iancu, R, Mohapel, P, Brundin, P, and Paul, G (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural brain research* 162: 1-10.

Meredith, GE, and Rademacher, DJ (2011). MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *Journal of Parkinson's disease* 1: 19-33.

Dawson, TM, and Dawson, VL (2014). Parkin plays a role in sporadic Parkinson's disease. *Neuro-degenerative diseases* 13: 69-71.

Alzheimer's Association. "2019 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimer's & Dementia* 15.3 (2019): 321-387.

Choi, Jin Woo, *et al.* "Cancer-associated splicing variant of tumor suppressor AIMP2/p38: pathological implication in tumorigenesis." *PLoS genetics* (2011).

Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. "Classification and basic pathology of Alzheimer disease." *Acta Neuropathol.* (2009): 5-36.

Viola KL, Klein WL. "Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis." *Acta Neuropathol.* (2015): 183-206.

De Strooper B, Vassar R, Golde T. "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol.* (2010): 99-107.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." *Cell.* (1989): 1083-93.

Lee, Y, Karuppagounder, SS, Shin, JH, Lee, YI, Ko, HS, Swing, D, *et al.* (2013). Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nature neuroscience.*

Szabo, C, Zingarelli, B, O'Connor, M, and Salzman, AL (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1753-1758.

Virag, L, Salzman, AL, and Szabo, C (1998). Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *Journal of immunology* 161: 3753-3759.

Barkauskaite, E, Jankevicius, G, and Ahel, I (2015). Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Molecular cell* 58: 935-946.

Brown et al., Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer, *Nature Med.* 12:585-591 (2006).

Brown et al., Endogenous microRNA can broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state, *Nature Biotech.* 25:12457-1467 (2007).

**[0228]** Предшествующее описание конкретных вариантов реализации изобретения настолько полно раскрывает общую природу изобретения, что другие могут, применяя знания в рамках компетенции в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать его для различных применений, не отклоняясь от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов описанных вариантов реализации изобретения, основанных на представленных в настоящей заявке идее и руководстве. Следует понимать, что используемая в настоящей заявке фразеология или терминология предназначена для описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должна быть интерпретирована квалифицированным специалистом в данной области техники в свете указанных идей и руководства.

**[0229]** Широта и объем настоящего изобретения не должны быть ограничены ни одним из описанных выше типичных вариантов реализации, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

**[0230]** Все различные аспекты, варианты реализации и варианты, описанные в настоящей заявке, можно комбинировать любыми и всеми вариантами.

**[0231]** Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отсрочивания начала заболевания у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

2. Способ ингибирования гибели нервных клеток у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

3. Способ лечения мышечной атрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что у указанного субъекта присутствует боковой амиотрофический склероз (БАС).

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что у указанного субъекта присутствует спинальная мышечная атрофия (СМА).

6. Способ повышения уровня выживаемости или увеличения продолжительности жизни субъекта с болезнью Паркинсона (БП), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

7. Способ предотвращения расстройства поведения, восстановления двигательного симптома и/или уменьшения нейронального повреждения у субъекта с болезнью Паркинсона (БП), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

8. Способ ингибирования вызванной олигомером бета-амилоида (A $\beta$ -O) гибели нервных клеток или вызванной A $\beta$ -O экспрессии p53 у субъекта с болезнью Альцгеймера (БА), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

9. Способ ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС) у субъекта со спинальной мышечной атрофией (СМА), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

10. Способ ингибирования повреждения нейромышечного синапса (НМС), ингибирования вызванных блокированием НМС дыхательной недостаточности, затруднения дыхания, ингибирования вызванной блокированием НМС мышечной судороги или фасцикуляции у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

11. Способ подавления аноиксиса и/или повышения стабилизации рецептора ламинина у субъекта с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), болезнью Паркинсона (БП), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

12. Способ по любому из пп. 1 - 11, отличающийся тем, что указанный вектор дополнительно содержит последовательность-мишень miR-142.

13. Способ по любому из пп. 1 - 12, отличающийся тем, что указанный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой промотор ретровируса (LTR), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор EF-1-альфа, промотор UB6, промотор бета-актина курицы, промотор CAG, промотор RPE65, промотор синапсина, промотор MeCP2, промотор CaMKII, промотор Hb9 или промотор опсина.

15. Способ по любому из пп. 12 - 14, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 расположена с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2.

16. Способ по любому из пп. 1 - 15, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

18. Способ по любому из пп. 1 - 17, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 10 или 11.

19. Способ по любому из пп. 1 - 18, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10 или 11.

20. Способ по любому из пп. 12 - 19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит АСАСТА.

21. Способ по пп. 12-19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 5.

22. Способ по любому из пп. 12 - 19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA).

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 5.

24. Способ по любому из пп. 12 - 19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит АСТТТА.

25. Способ по пп. 12 - 19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 7.

26. Способ по любому из пп. 12 - 19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности нуклеотидов SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG).

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 содержит последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7.

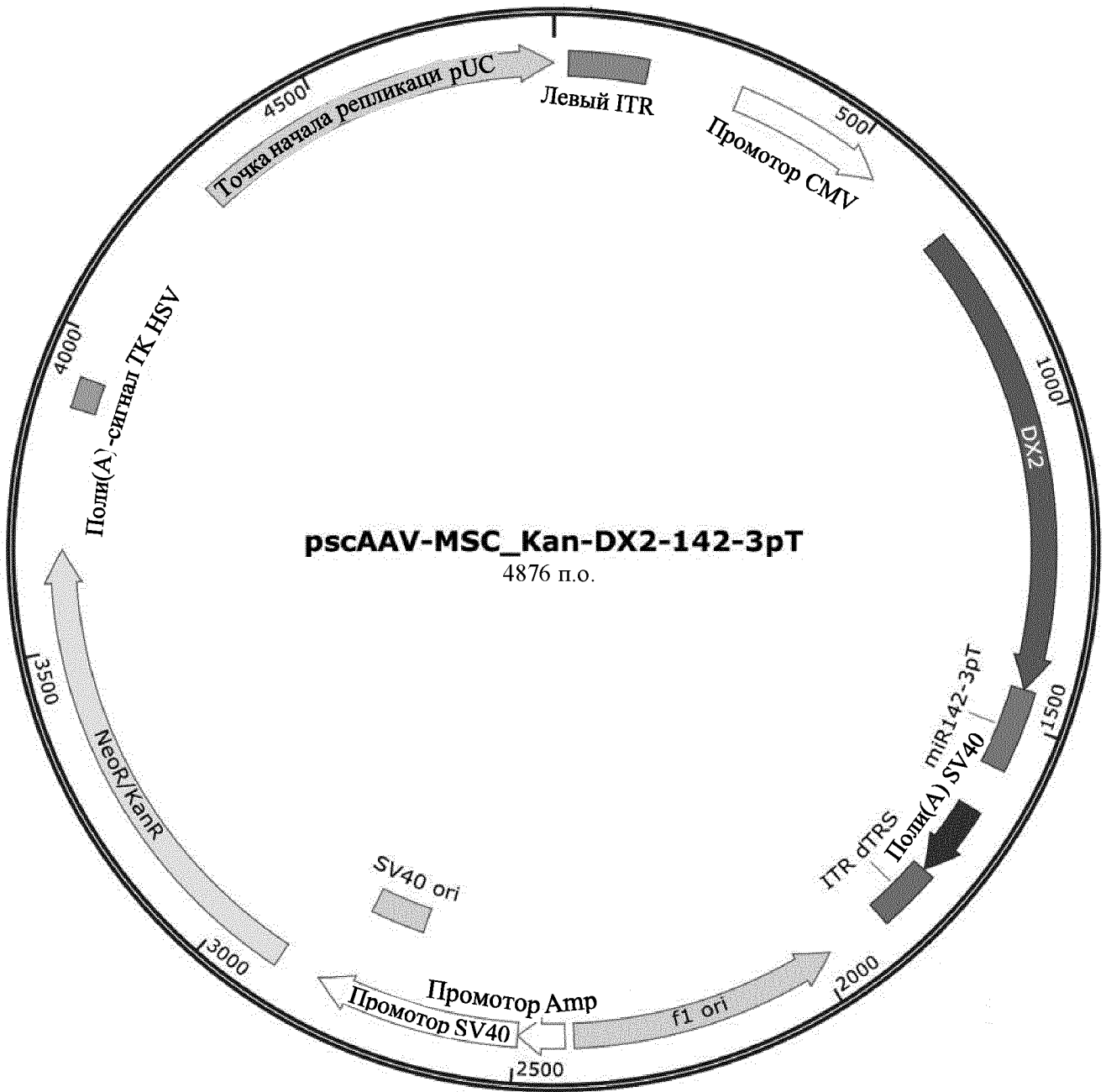
28. Способ по любому из пп. 12 - 27, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень miR-142 повторяется 2 - 10 раз.

29. Способ по любому из пп. 1 - 28, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса лейкоза мышей (MLV), вируса саркомы/лейкоза птиц (ASLV), вируса некроза селезенки (SNV), вируса саркомы Рауса (RSV), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вируса корьей оспы или вируса простого герпеса.

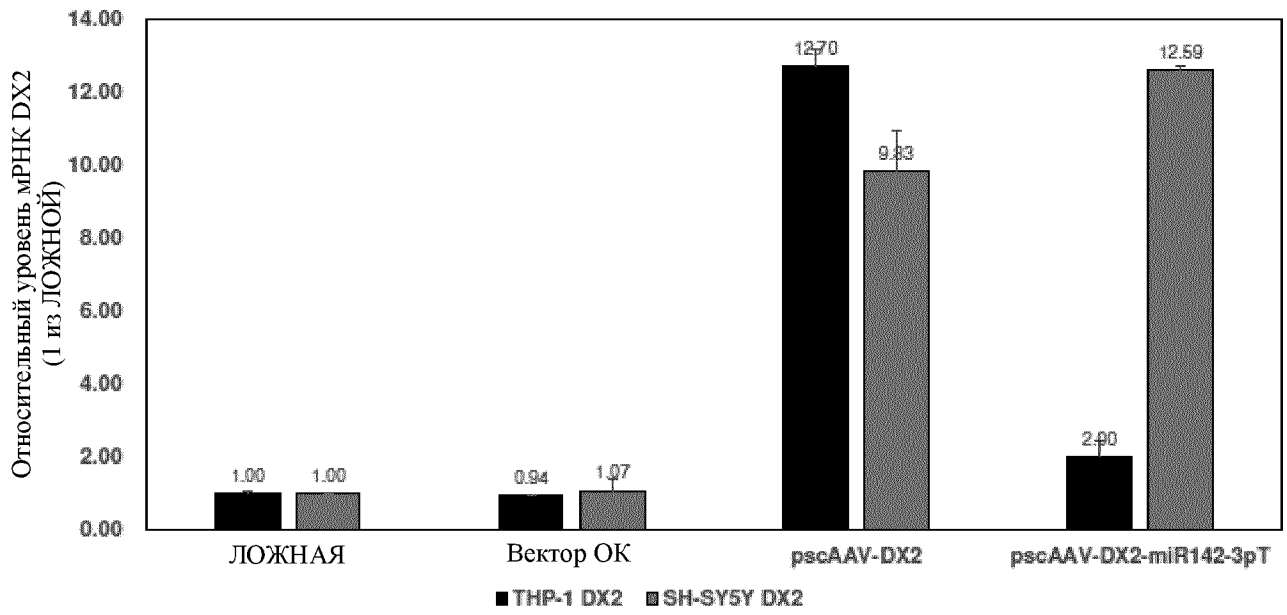


Фигура 1

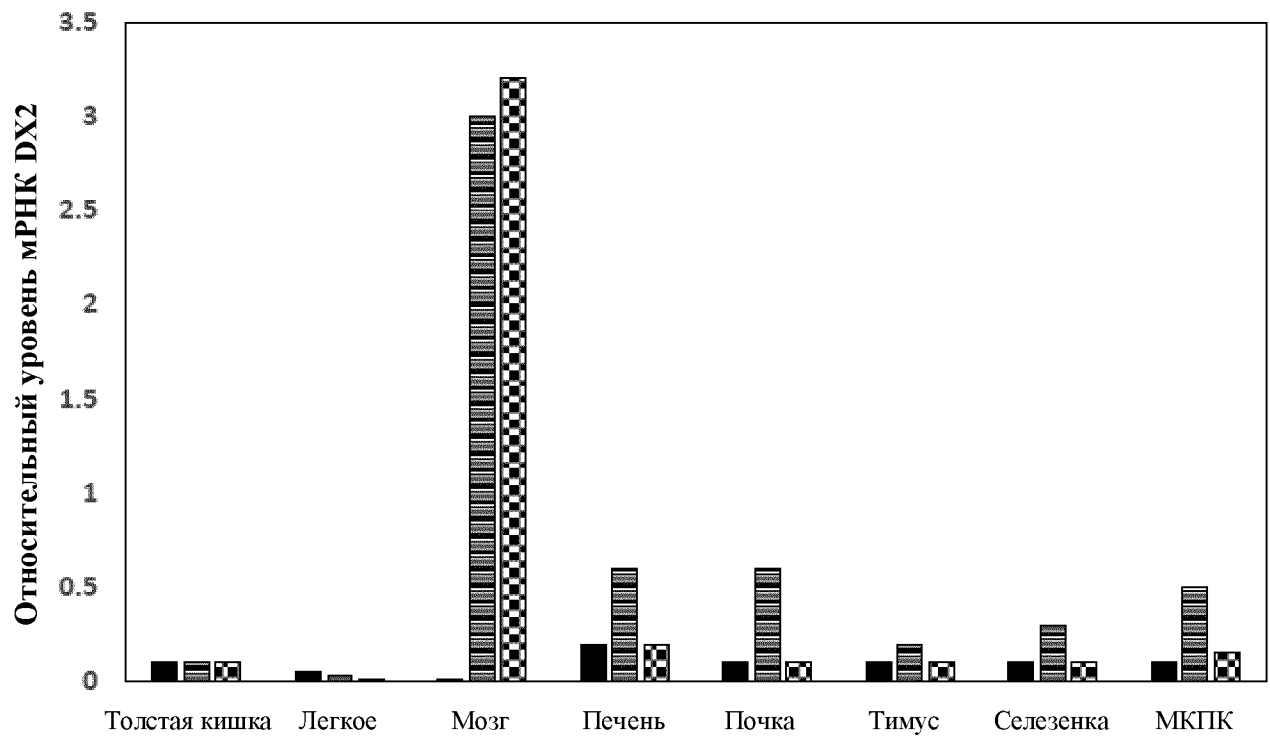


**Фигура 2**

Нокдаун экспрессии DX2 посредством miR142-3pT



Фигура 3



Фигура 4

ccagaagcttgctagctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacacta  
cagatatctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacaaagctt  
 gtag

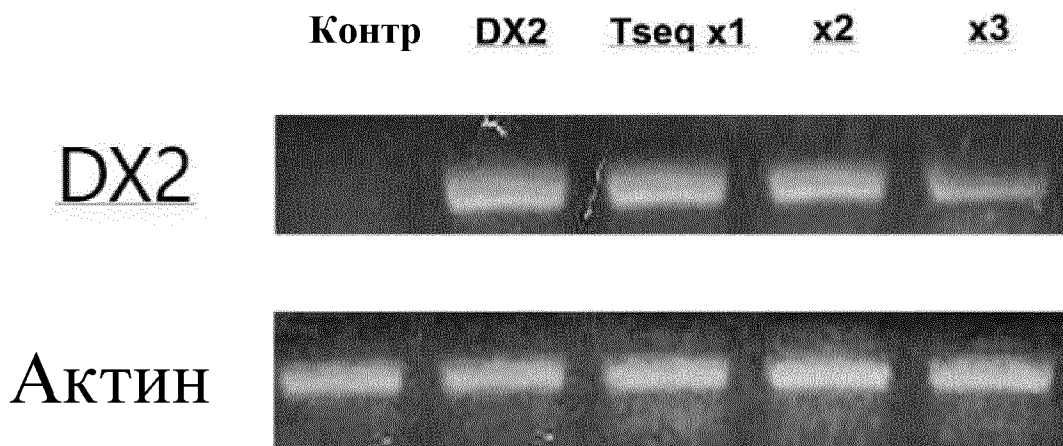
Фигура 5А



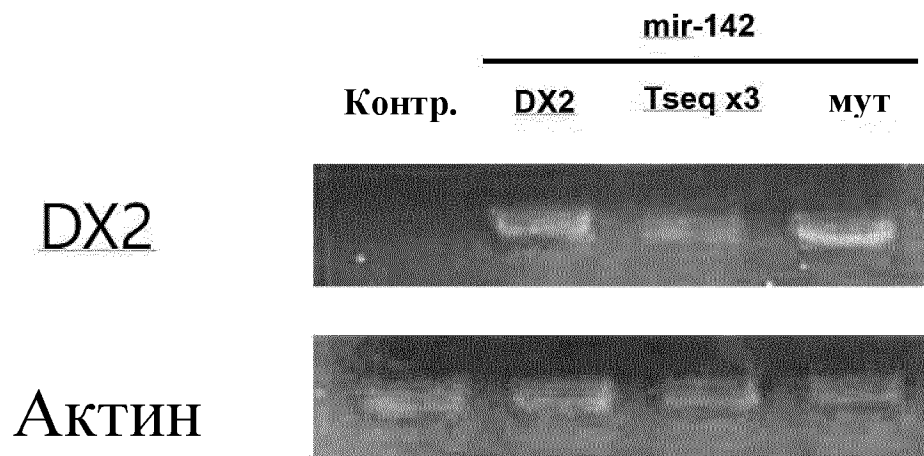
▼ Коровая последовательность для связывания

▼ Мутантная последовательность

Фигура 5В

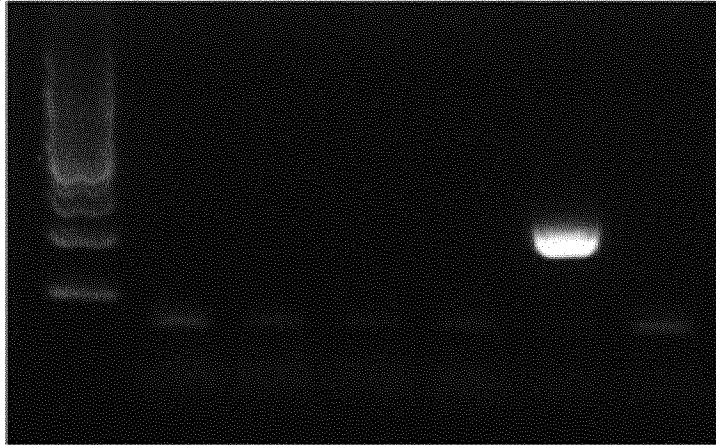


## Фигура 6

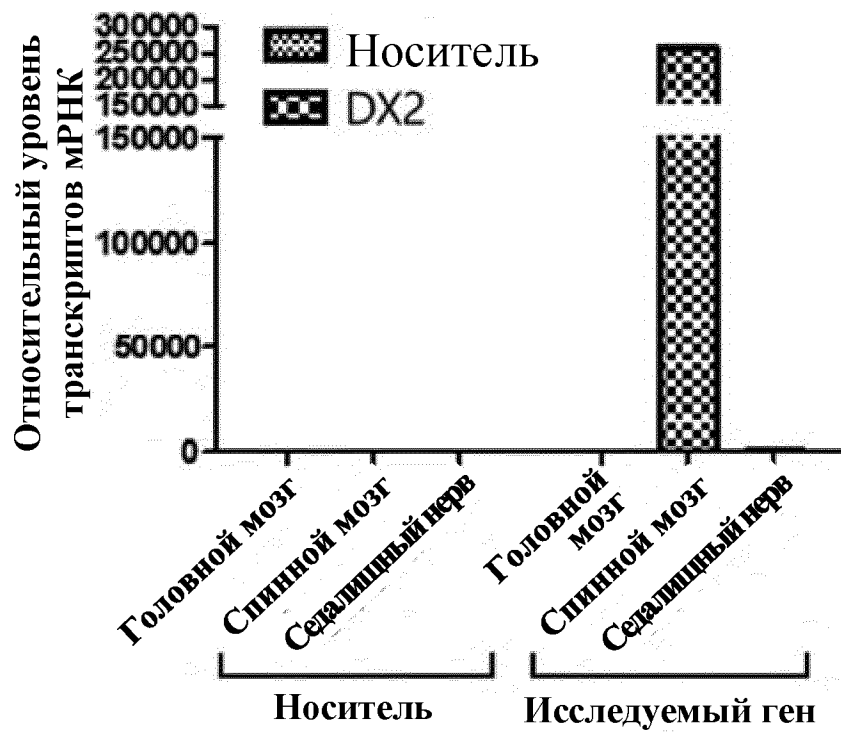


Фигура 7

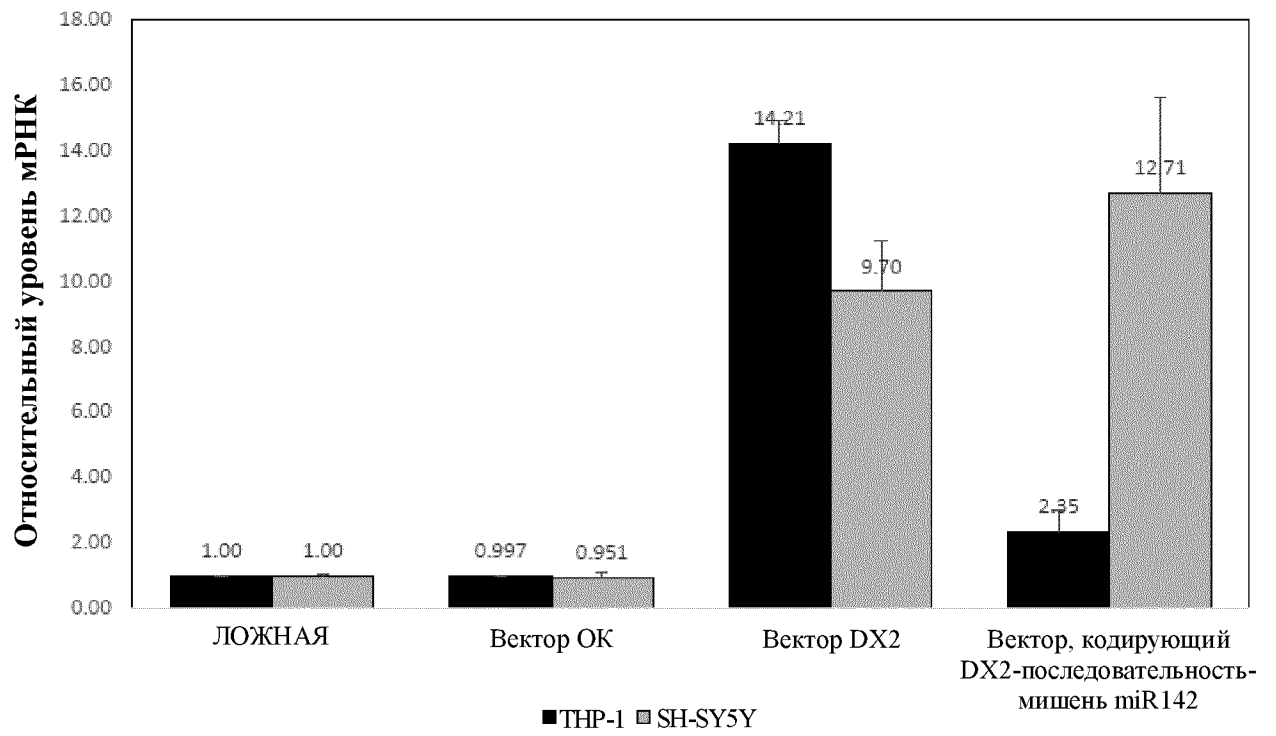
## Распределение в модели БАС



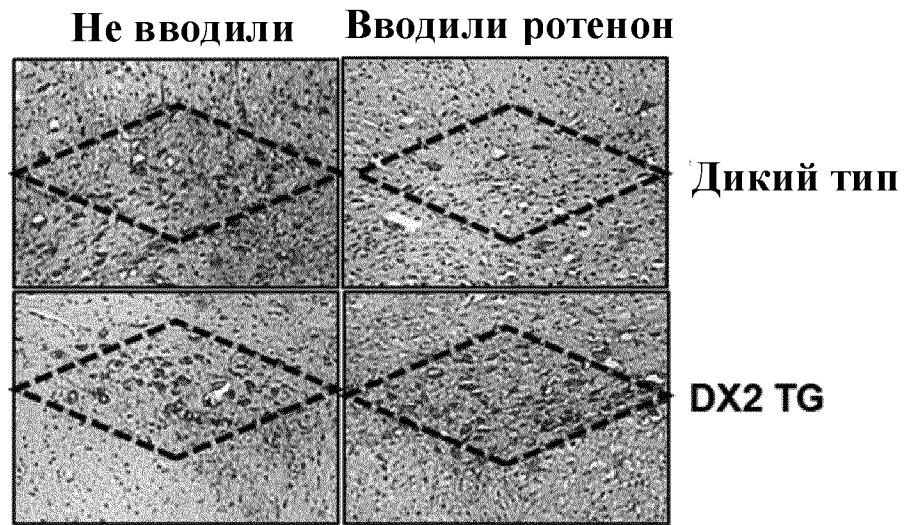
Инtrateкальная инъекция с последующей кРВ-ПЦР



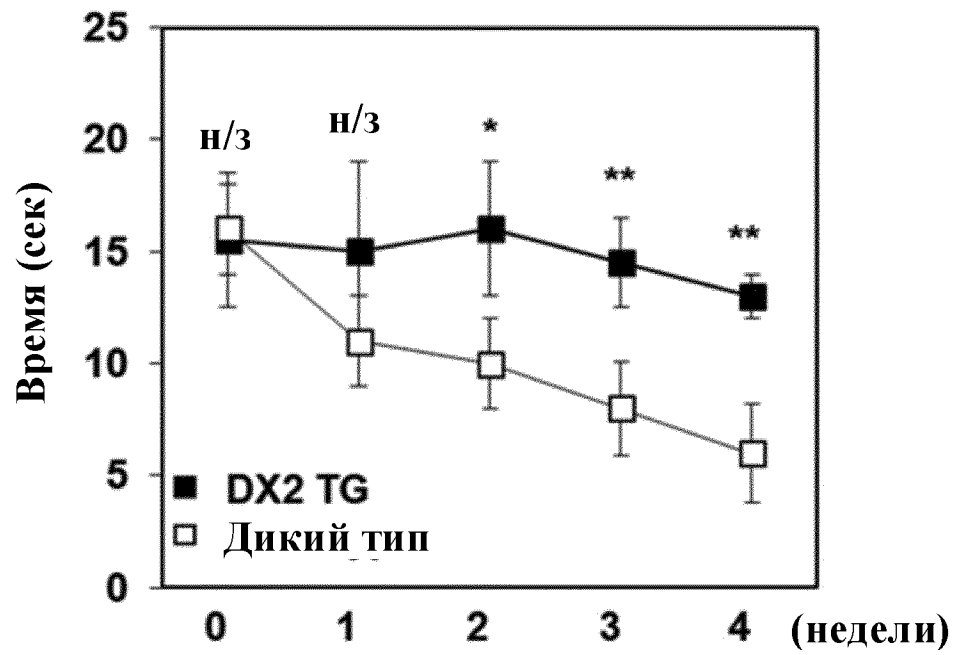
Фигура 8



Фигура 9А

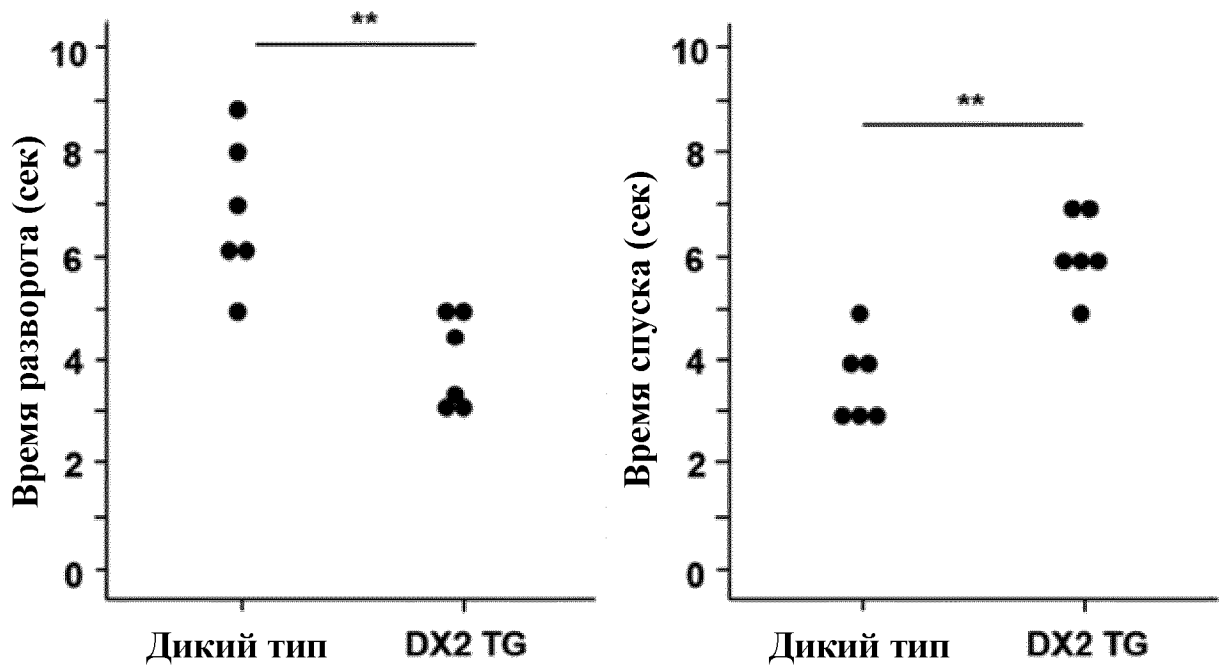


Фигура 9В

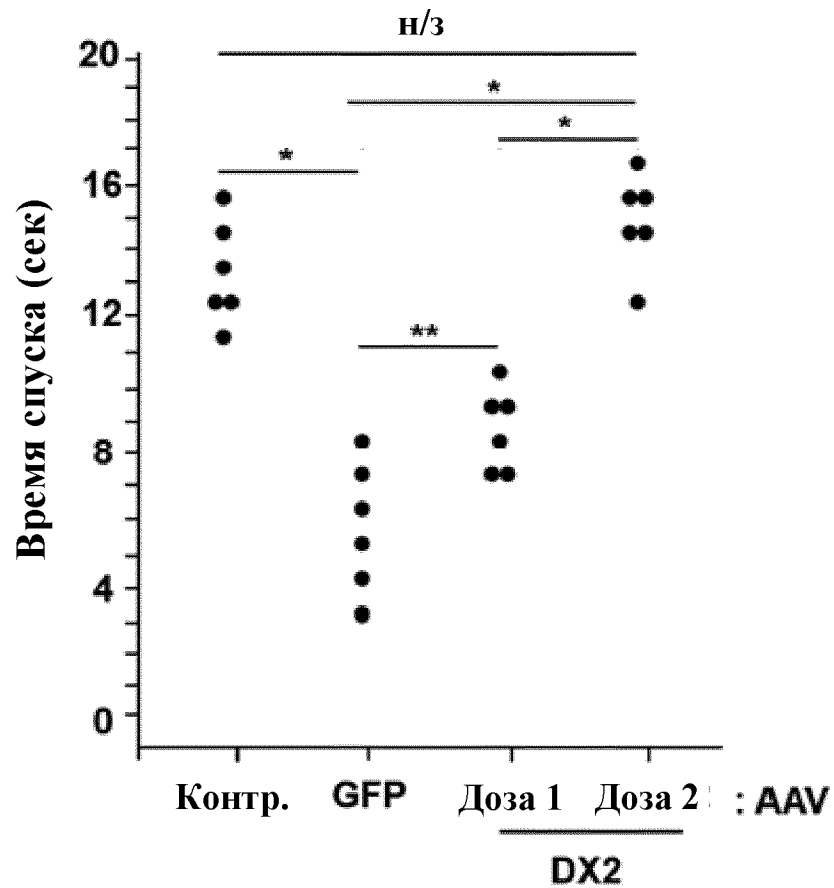




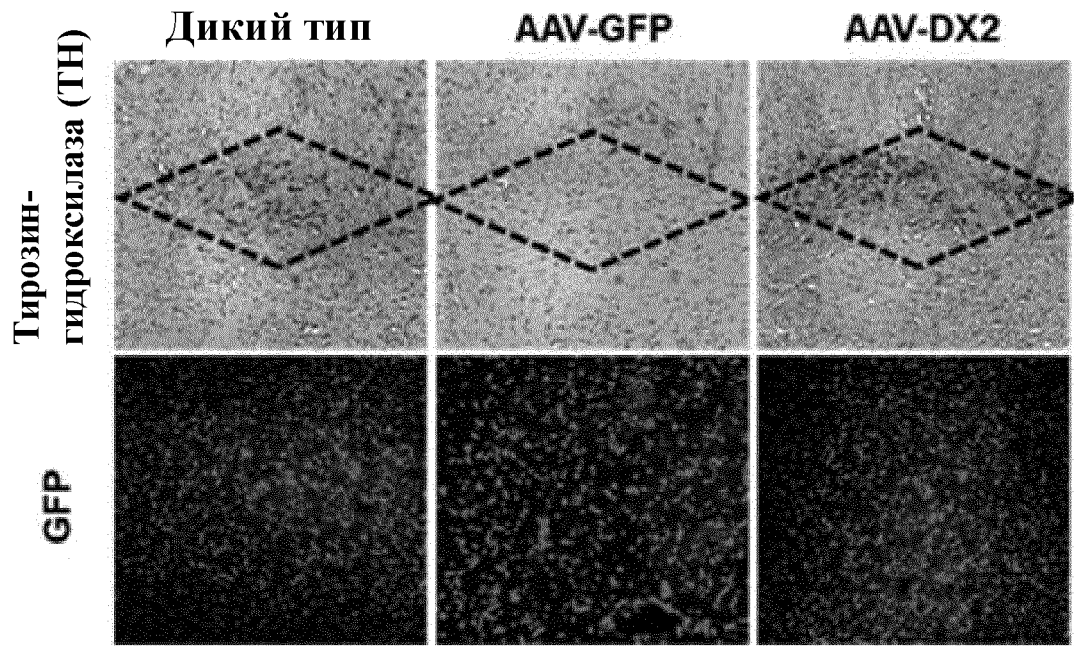
Фигура 9С



Фигура 9D

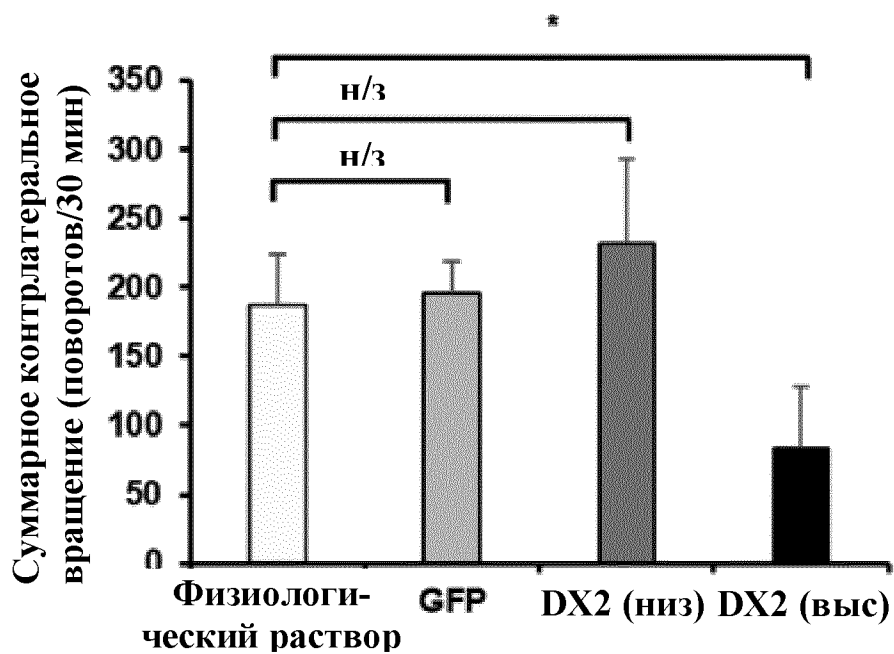


## Фигура 9Е



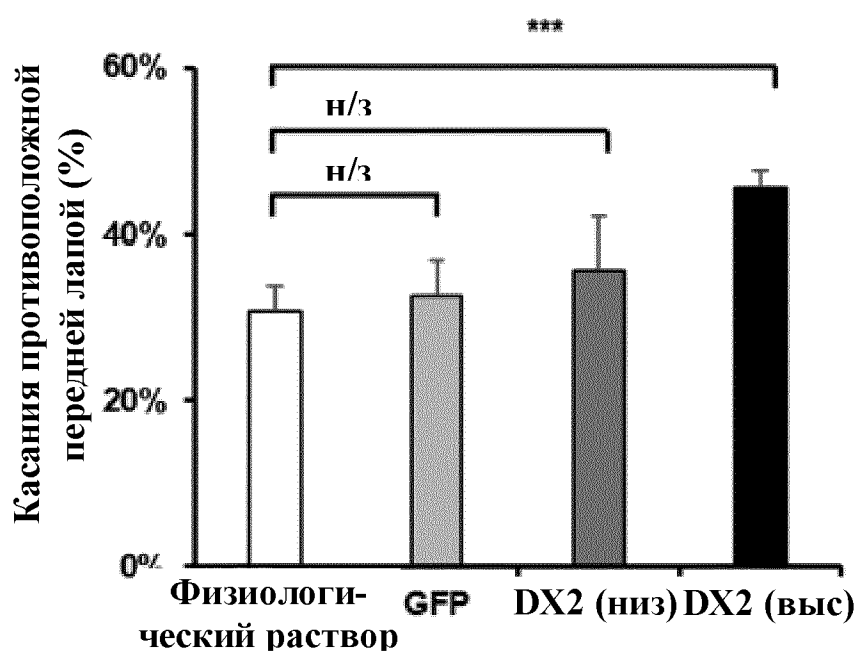
## Фигура 10А

## Апоморфиновый тест



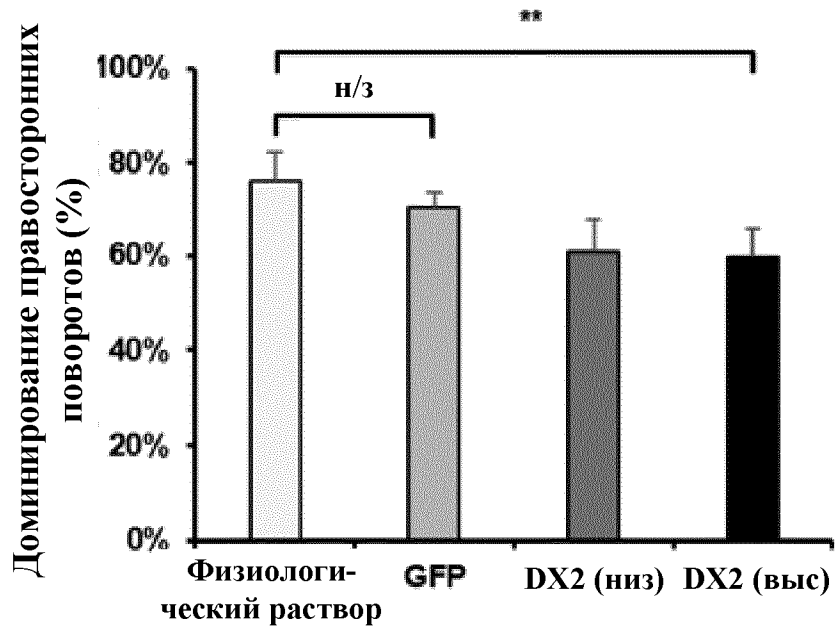
## Фигура 10В

## Тест на цилиндре



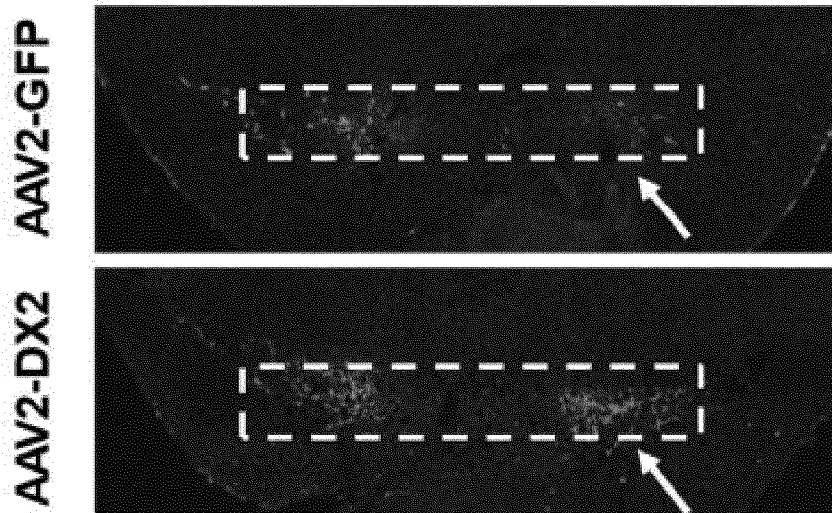
## Фигура 10С

Тест на повороты в подвешенном состоянии (EBS)

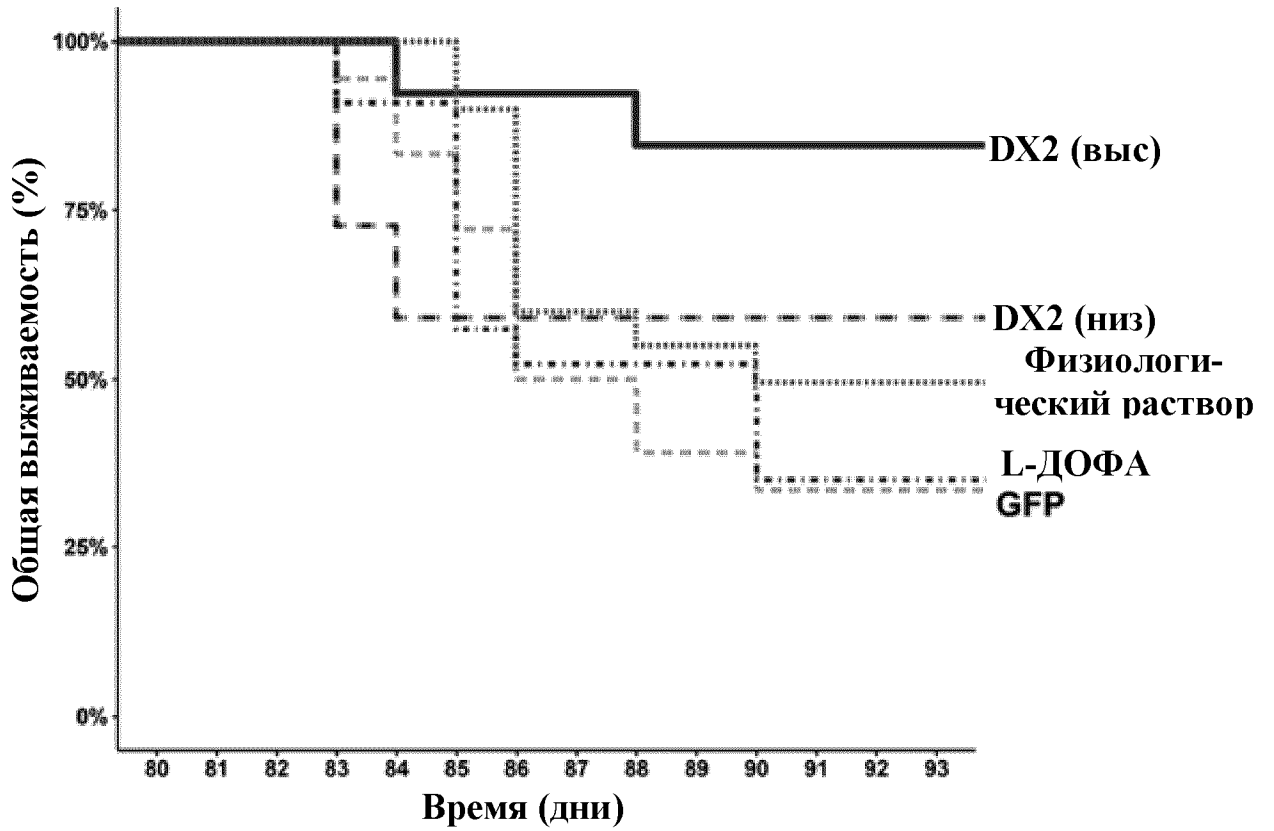


## Фигура 10D

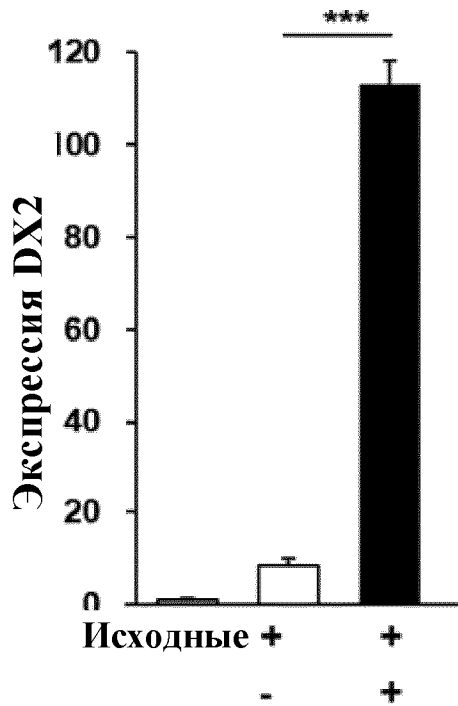
Тирозингидроксилаза (TH)



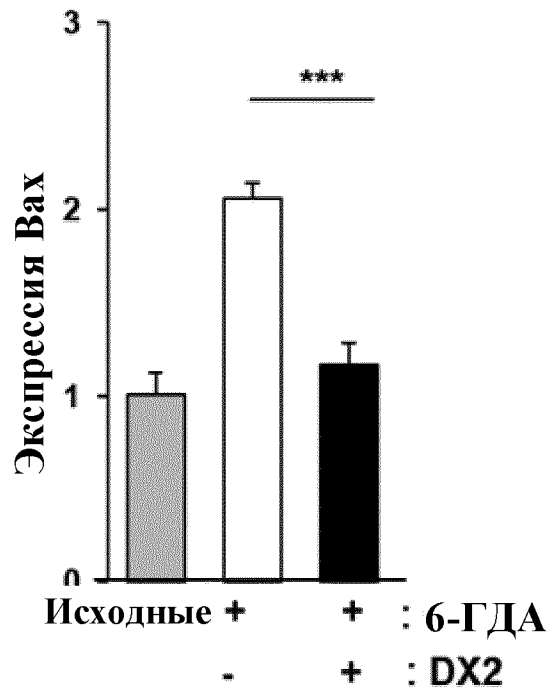
Фигура 10Е



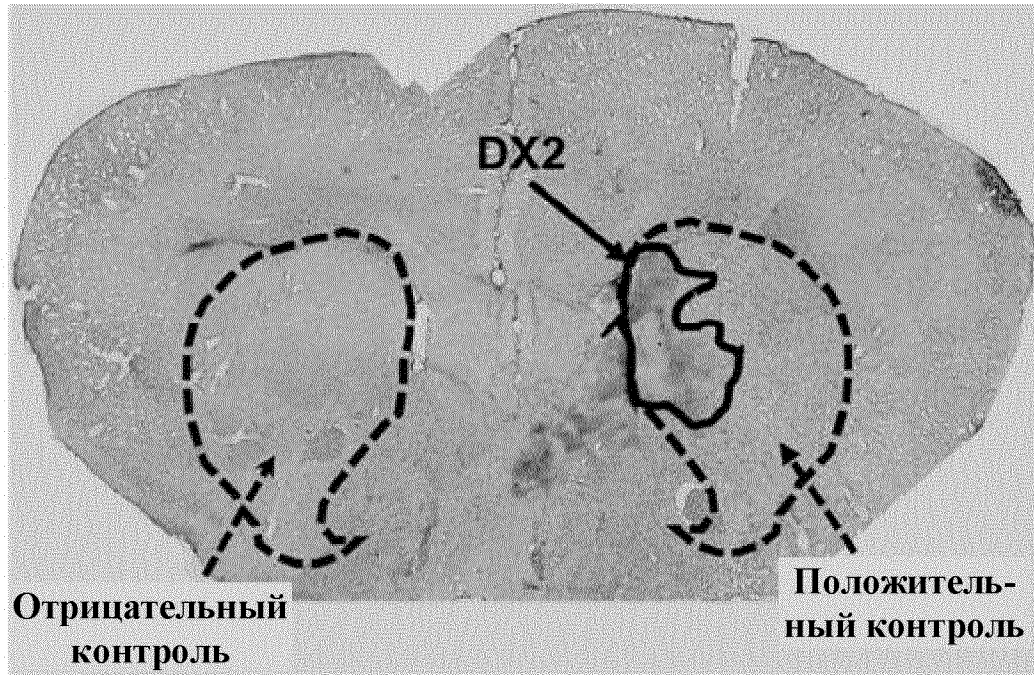
Фигура 10F



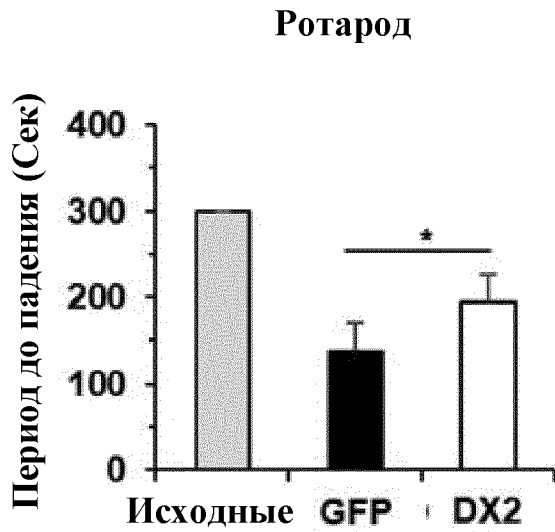
Фигура 10G



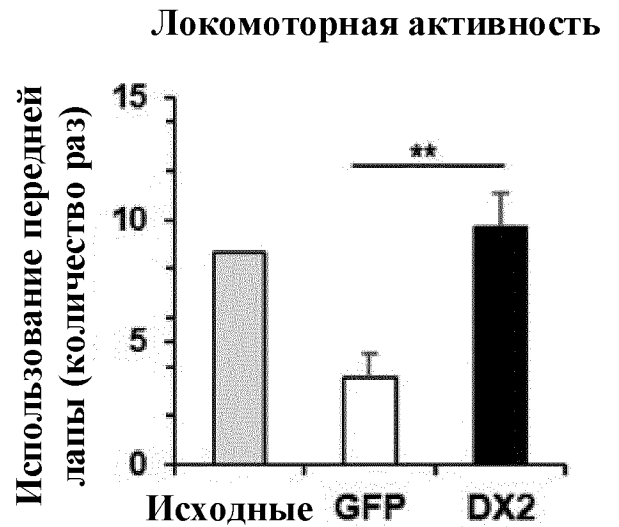
**Фигура 10Н**



Фигура 11А



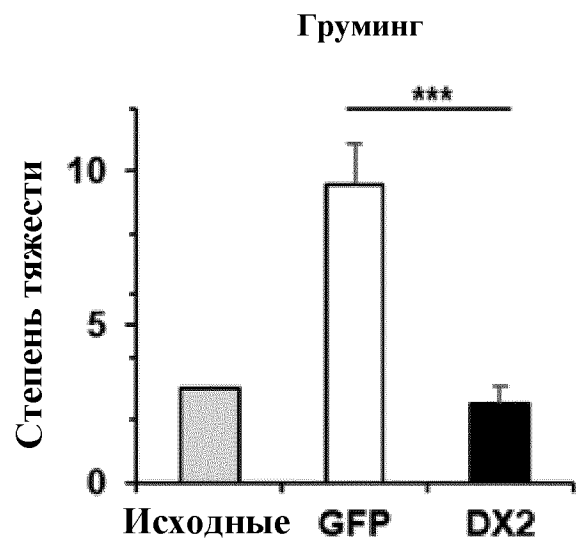
Фигура 11В



Фигура 11С

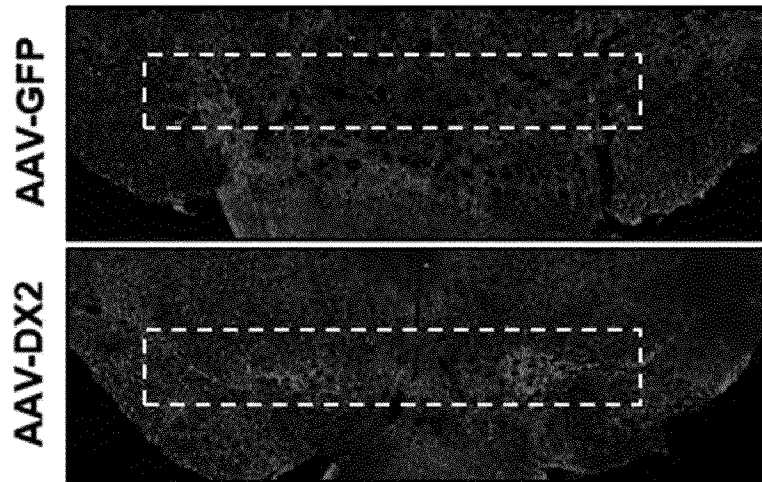


Фигура 11D

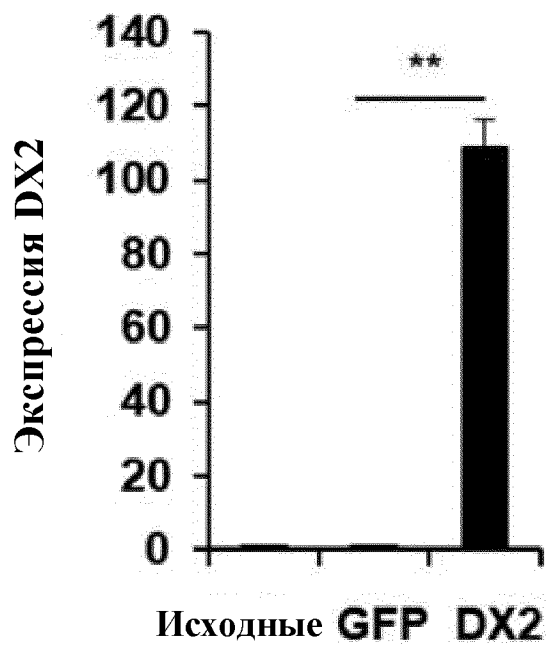


## Фигура 11Е

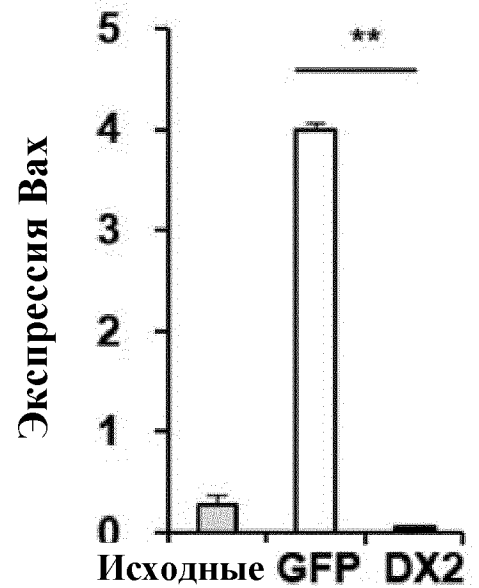
## Тирозингидроксилаза (ТН)



## Фигура 11F

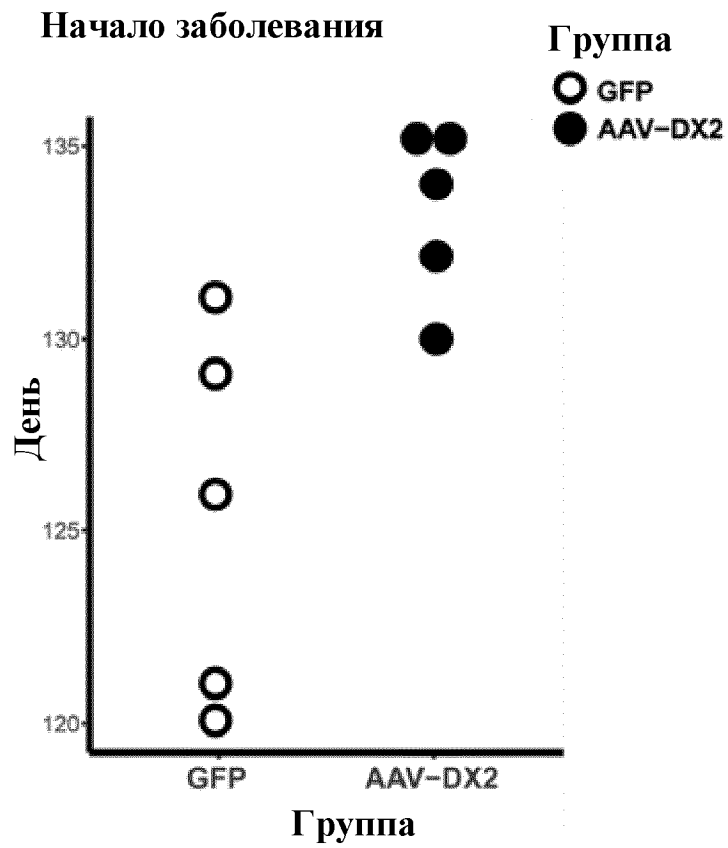


## Фигура 11G



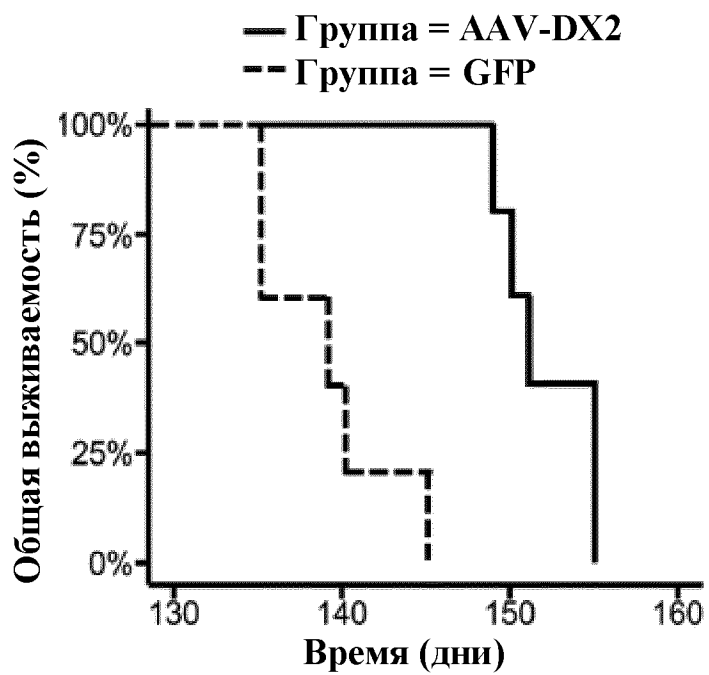


Фигура 12А

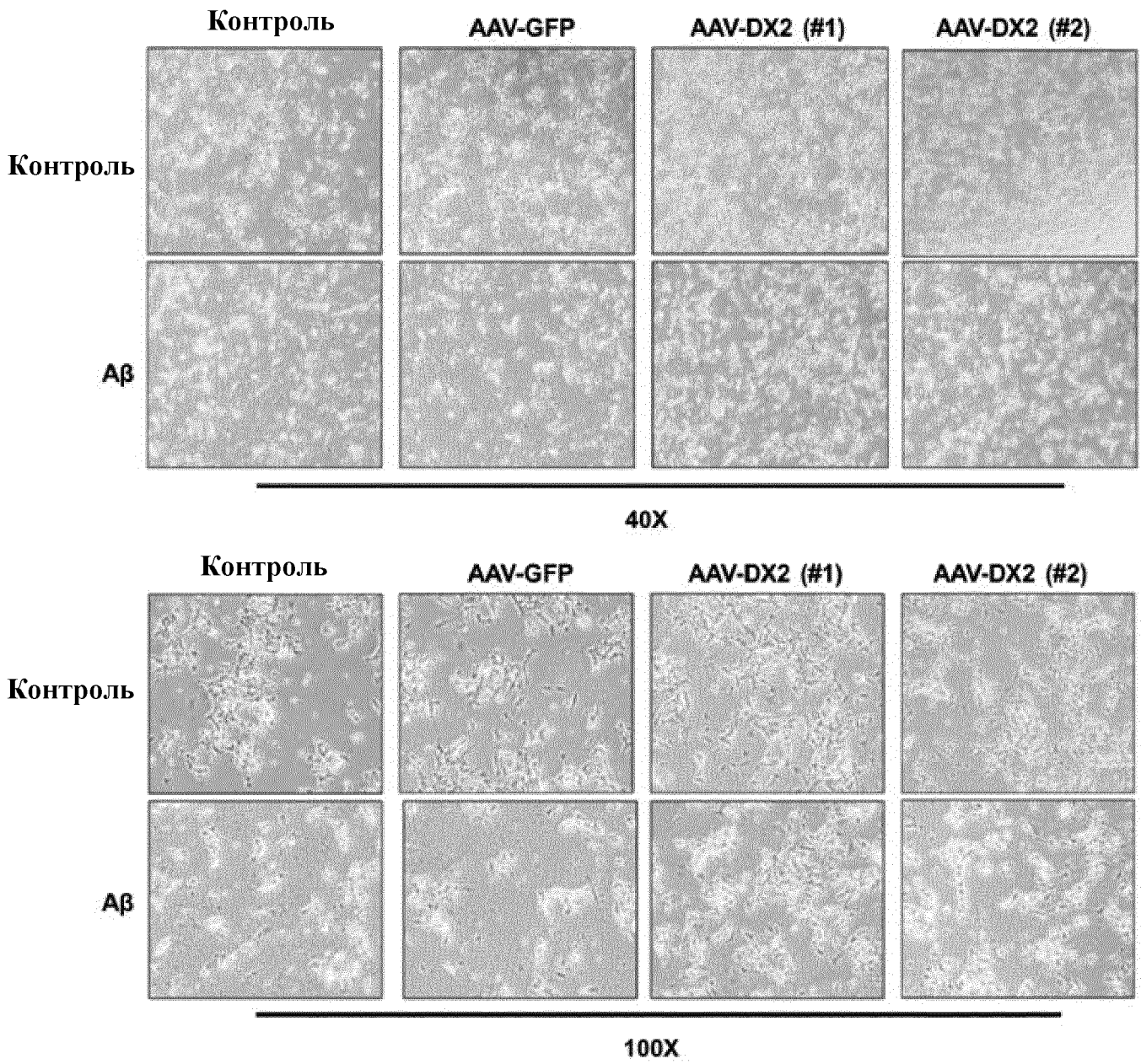


Фигура 12В

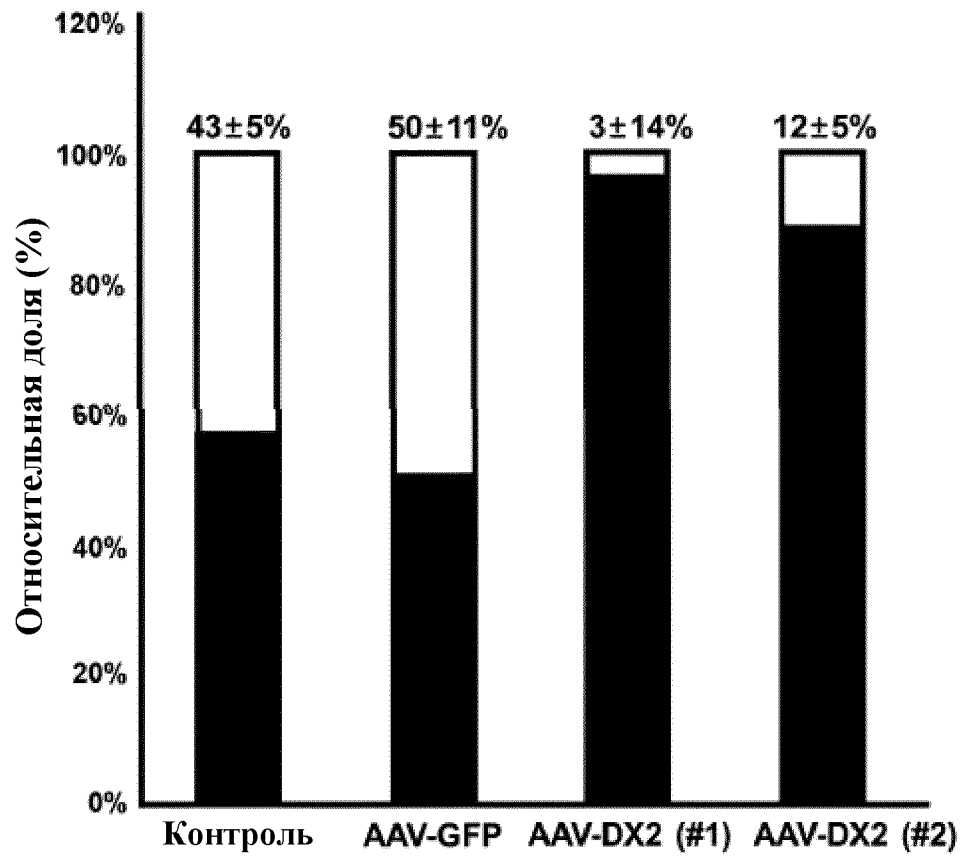
Выживаемость



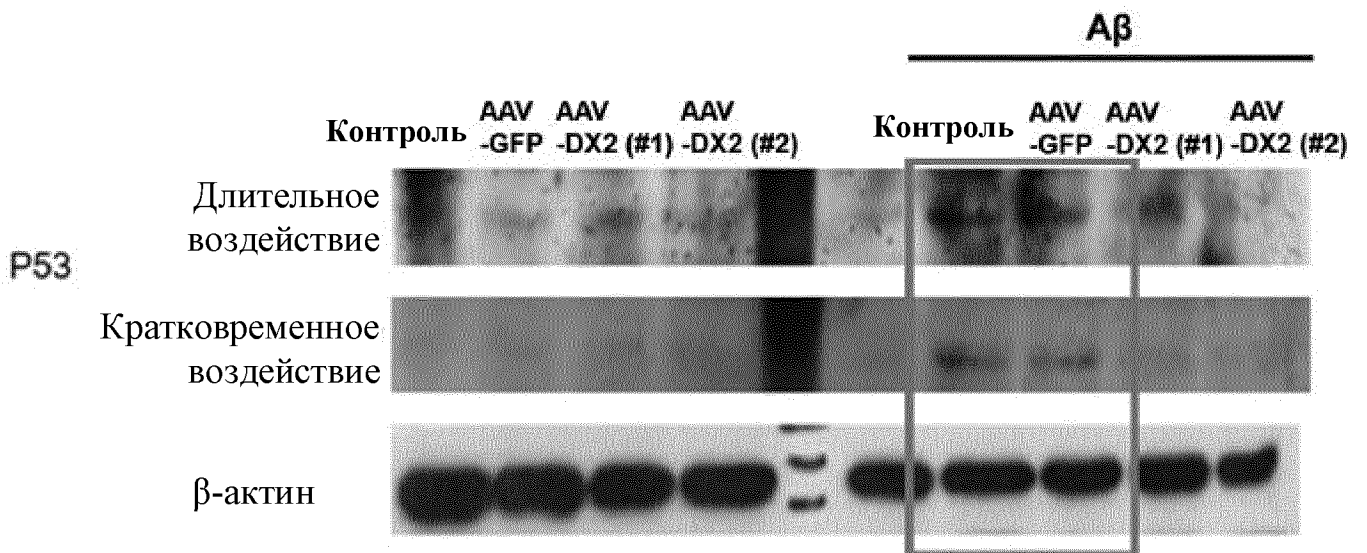
Фигура 13



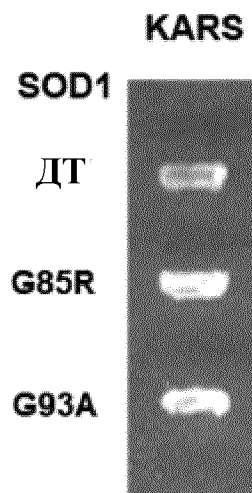
Фигура 14



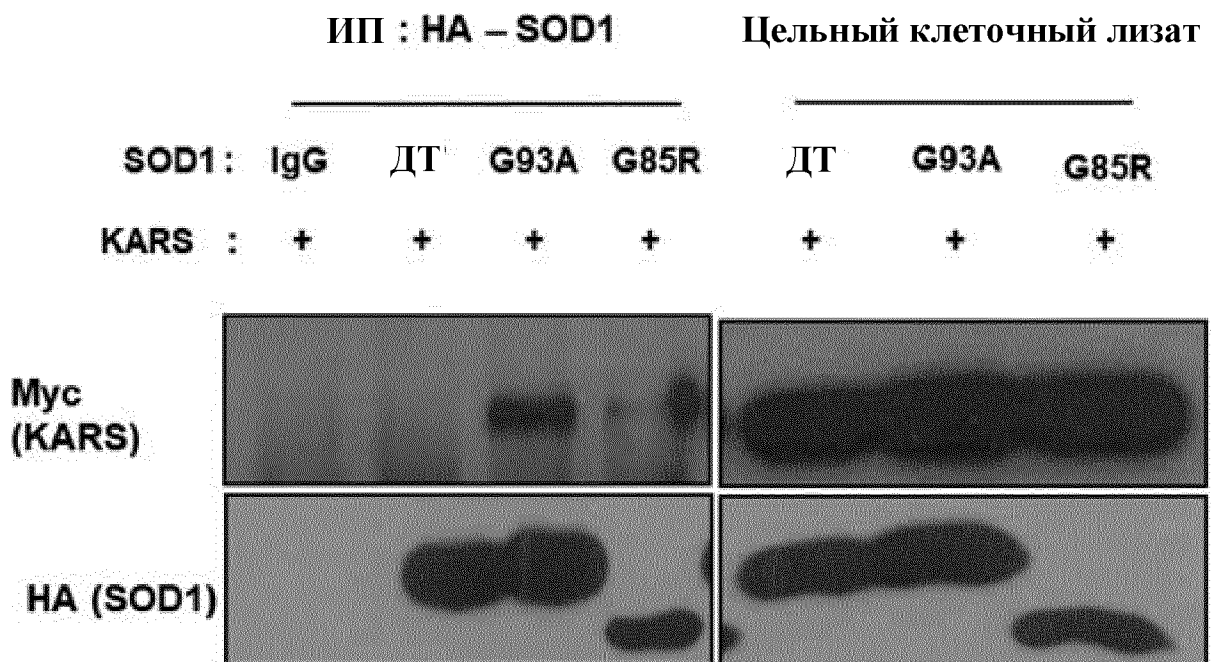
Фигура 15



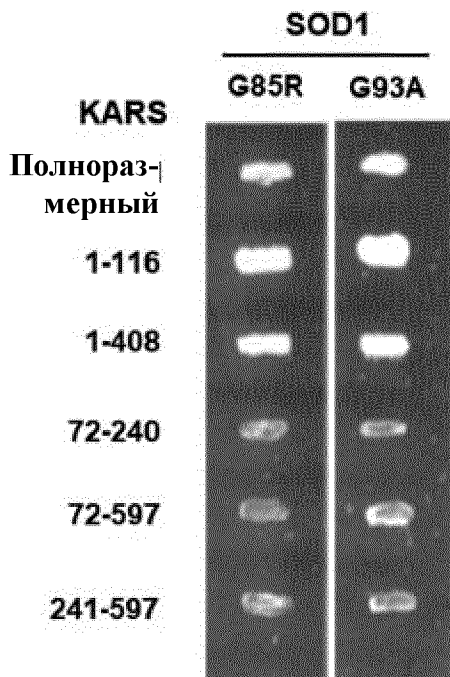
Фигура 16А



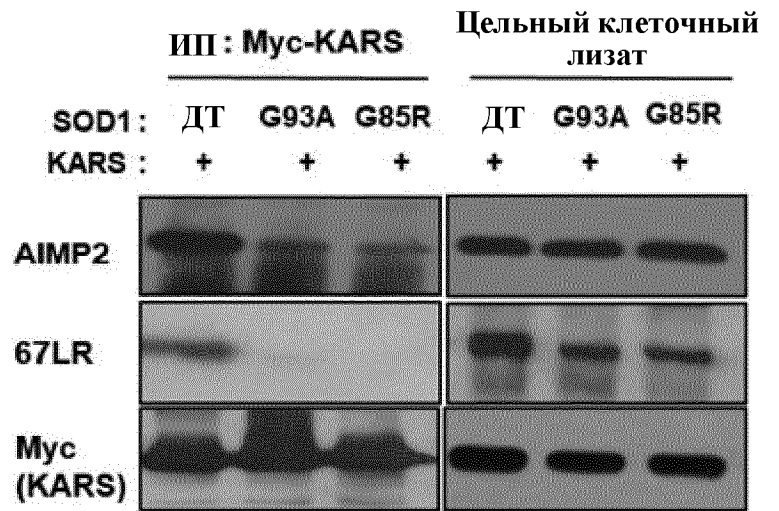
Фигура 16В



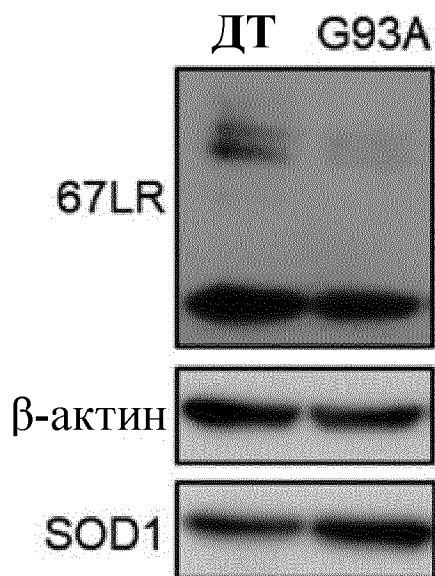
Фигура 16С



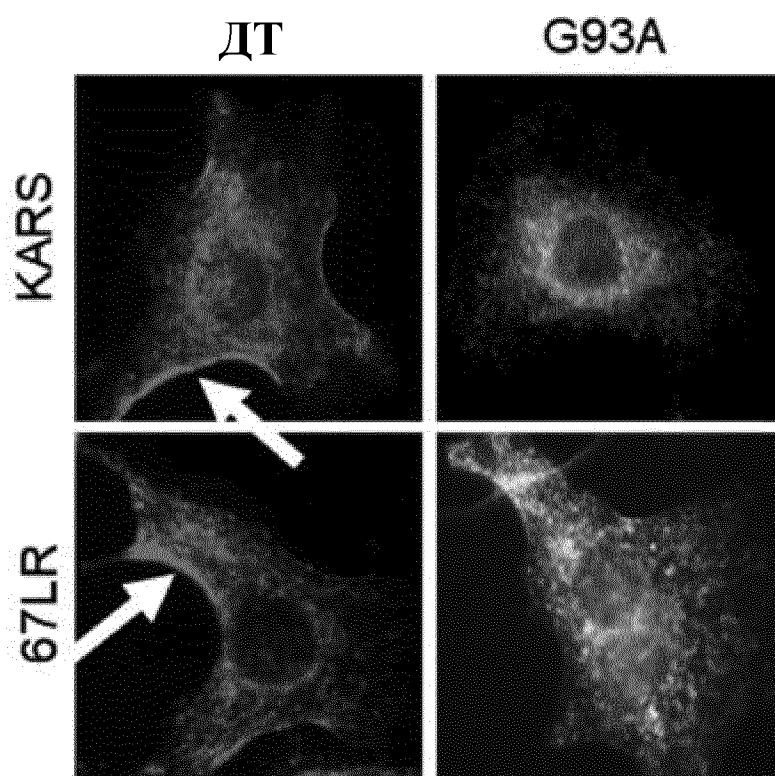
Фигура 16D



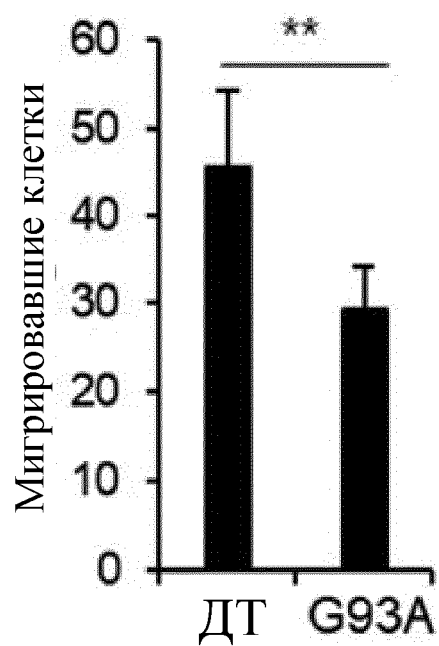
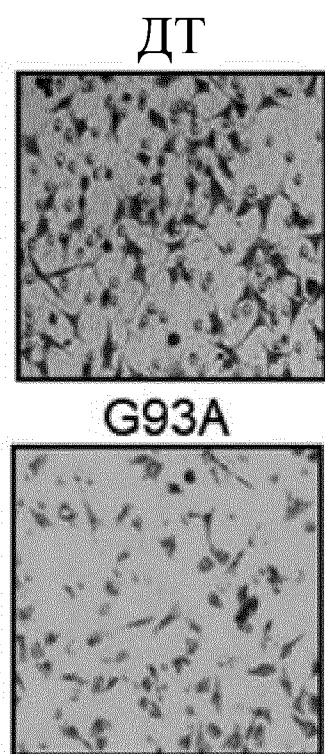
Фигура 17А

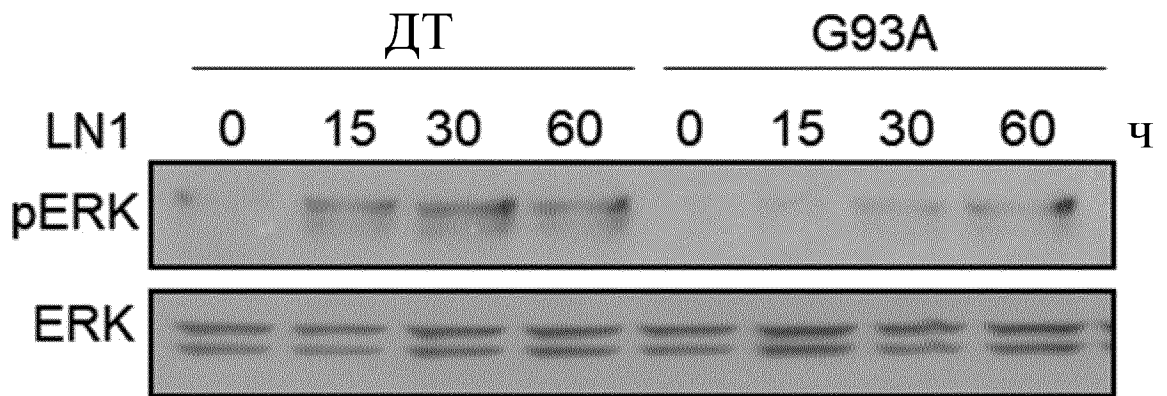
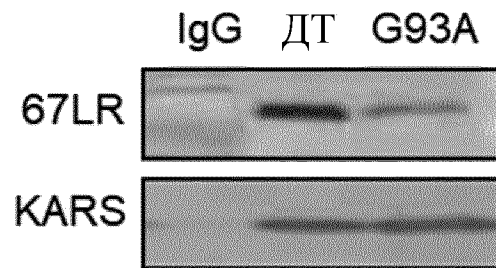


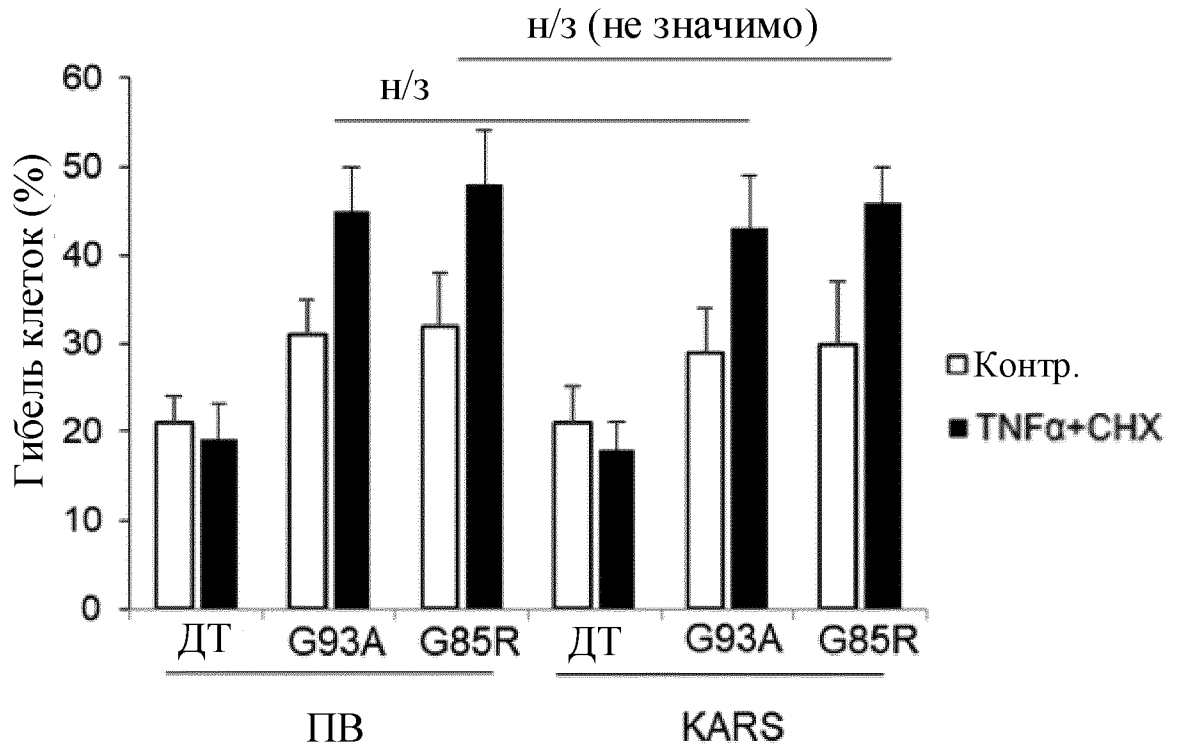
Фигура 17В



Фигура 17С



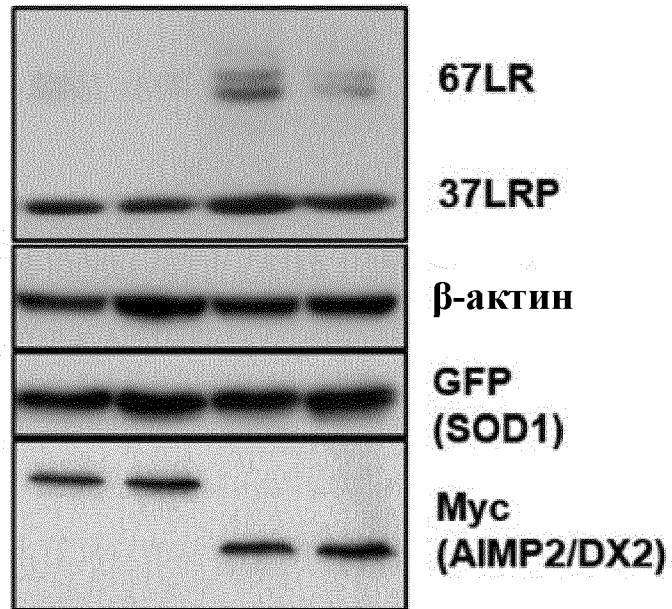
**Фигура 17D****Фигура 17E****Фигура 17F**



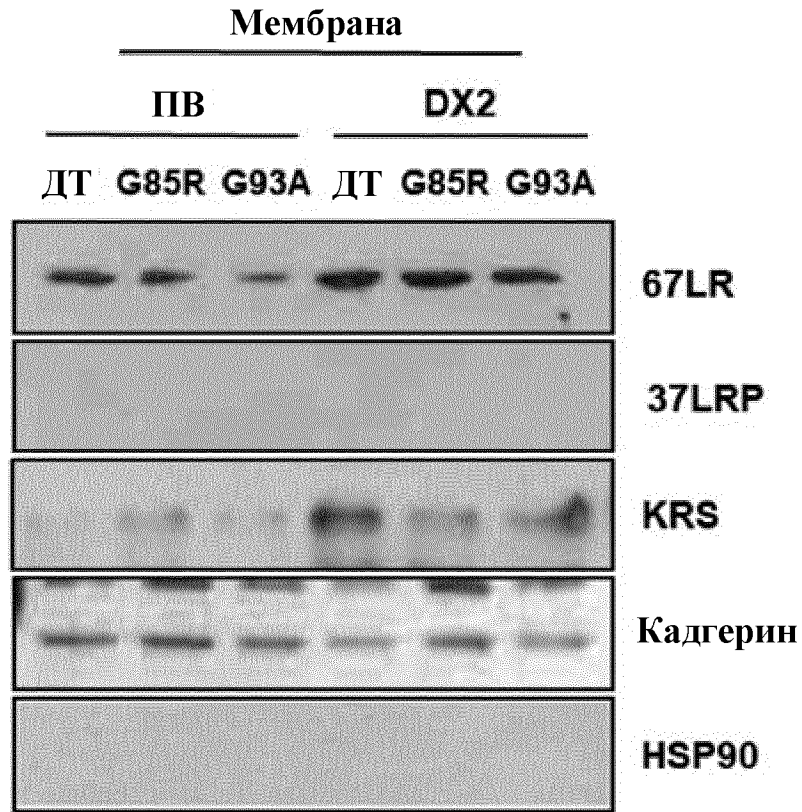


### Фигура 18А

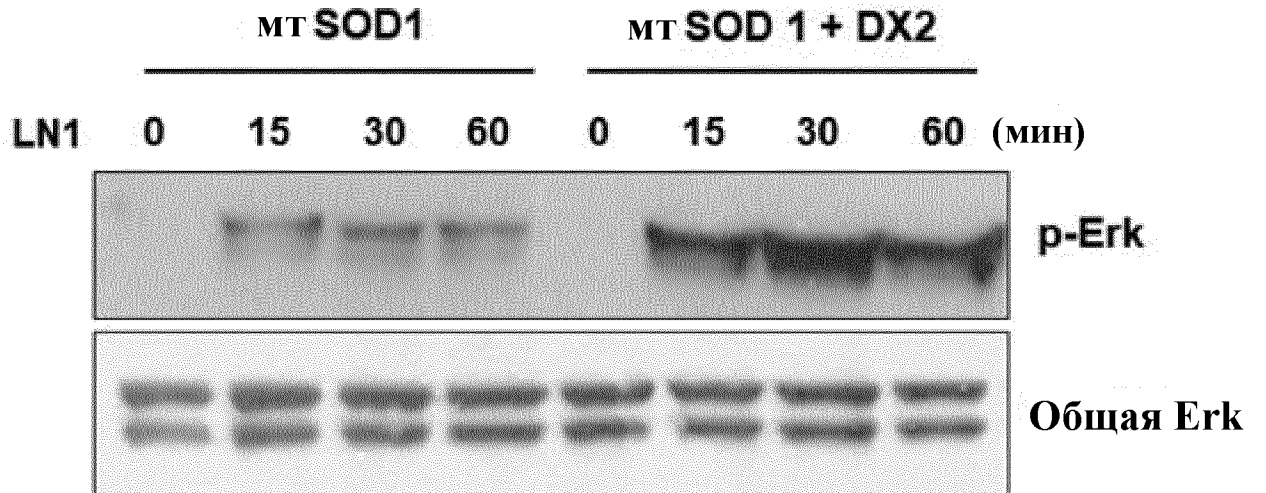
-	-	+	+	: DX2 (Мус)
+	+	-	-	: AIMP2 (Мус)
ДТ	G93A	ДТ	G93A	: SOD1 (GFP)



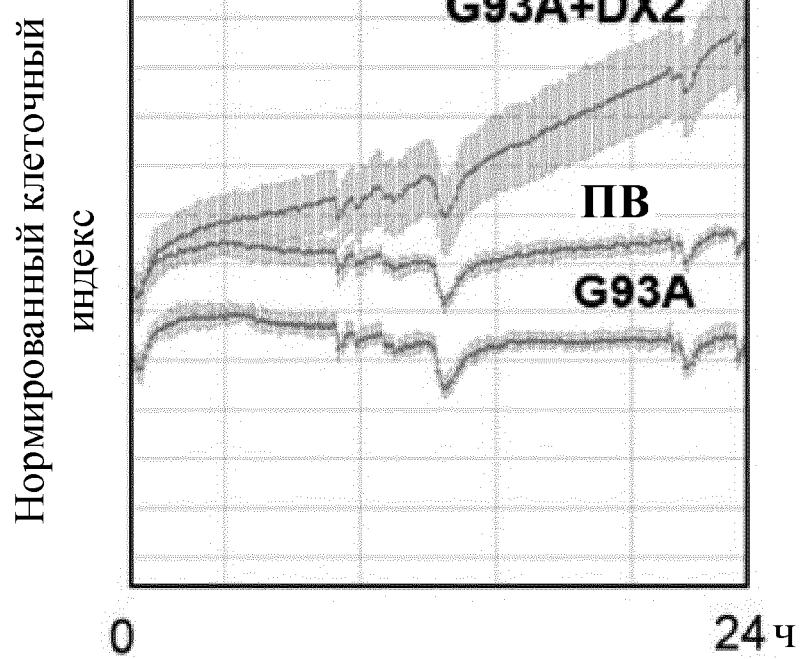
### Фигура 18В



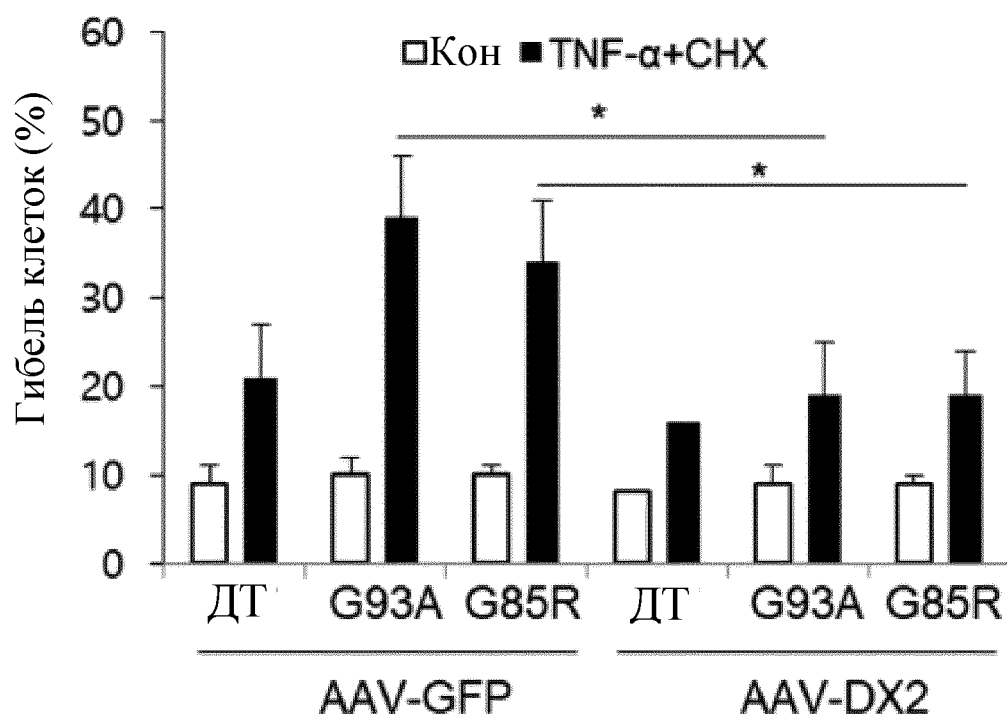
Фигура 18С



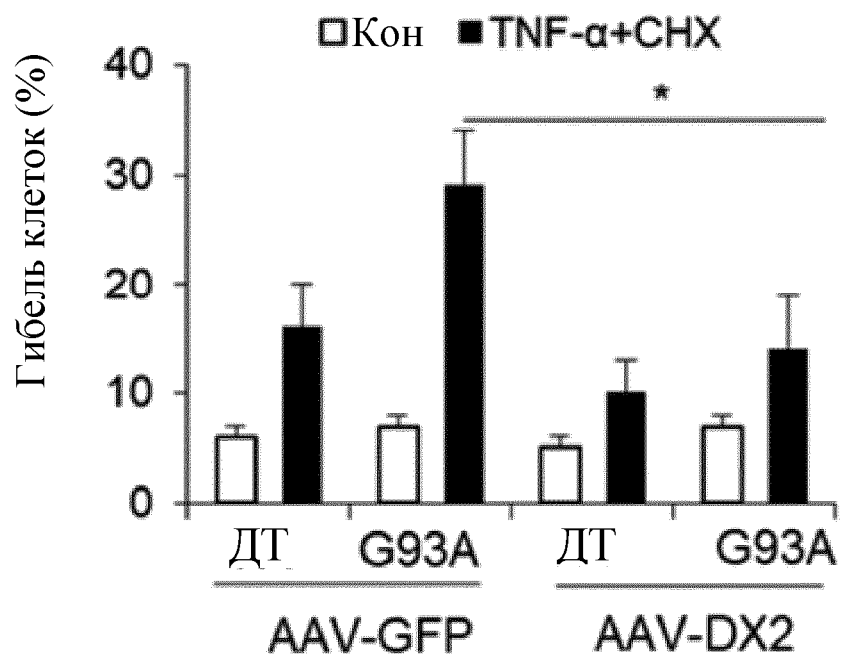
Фигура 18D

TNF- $\alpha$ 

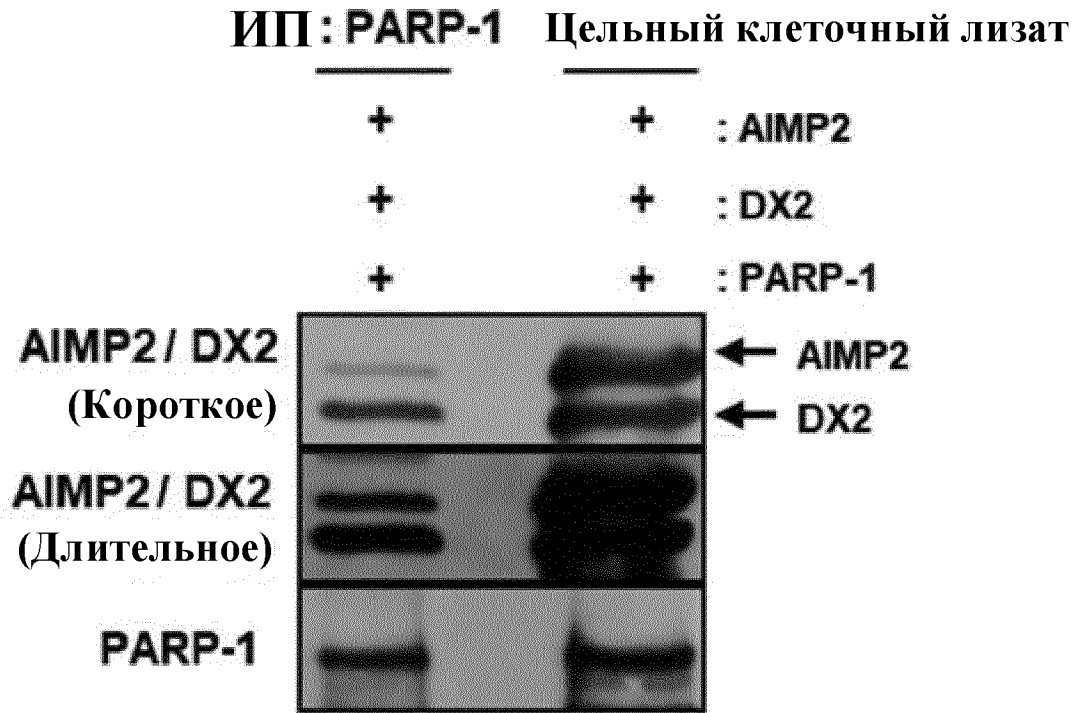
Фигура 19А



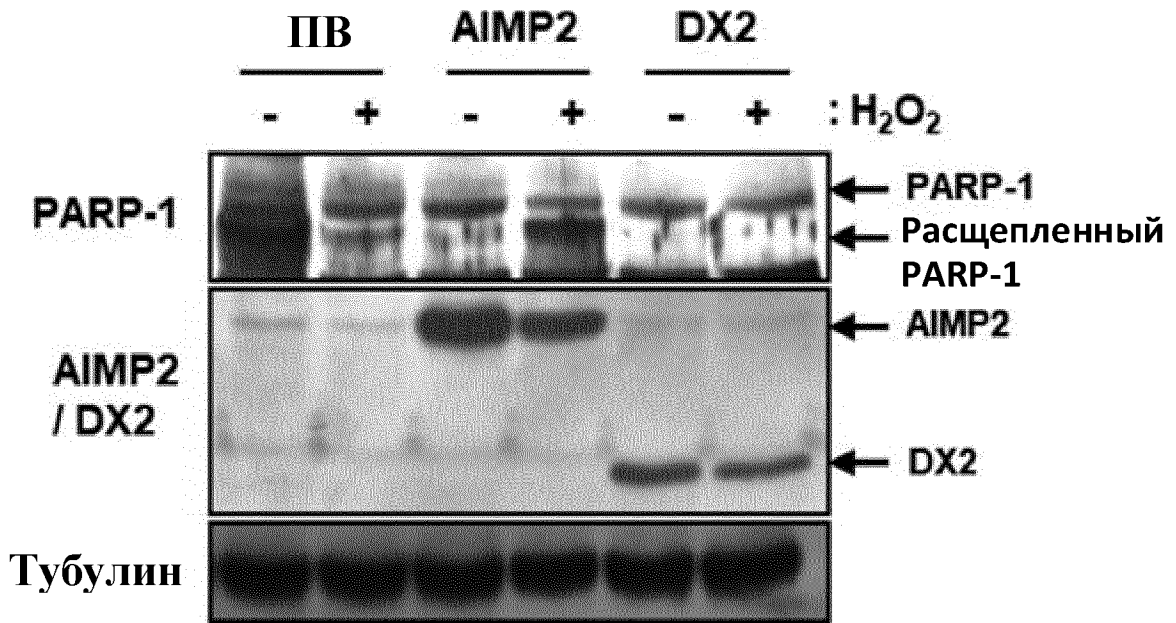
Фигура 19В



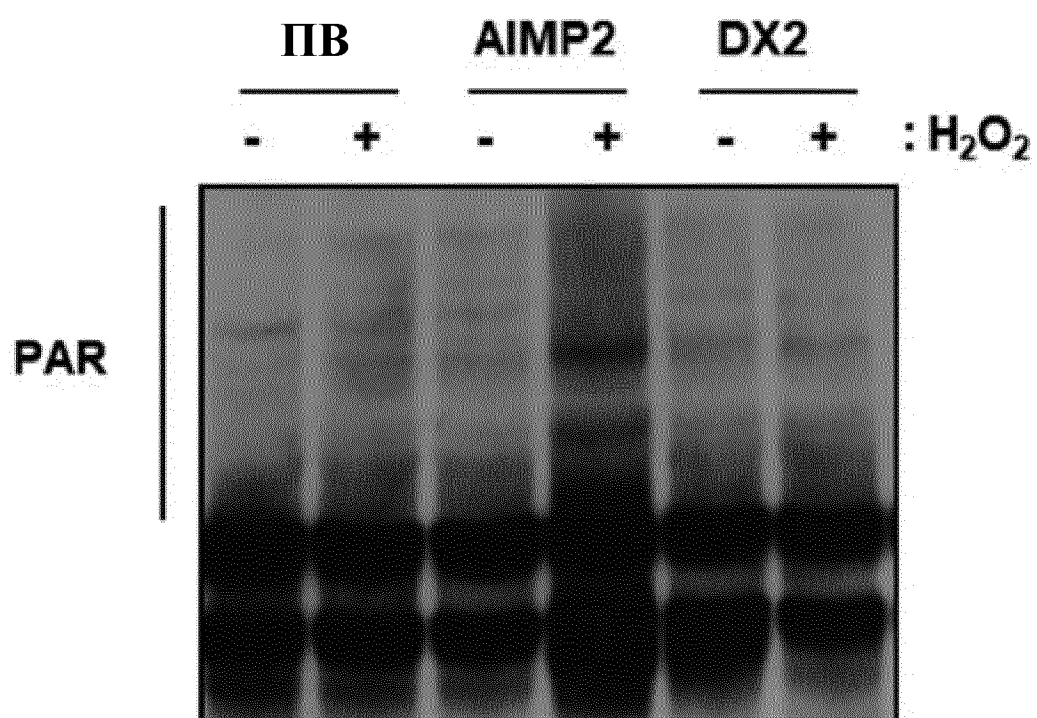
Фигура 20А



Фигура 20В



Фигура 20С



1 SEQ ID NO: 12 ААН13630.1 белк. посл. (320 АК)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNYHGRSYGPAPGAGHYQEEENLSLQALESRDDILKRLYELKAAYDGLSKMI	80
2 SEQ ID NO: 10 экзон 2	1	-----EESNLQALESRDDILKRLYELKAAYDGLSKMI	35
3 SEQ ID NO: 2 NP_001313536.1(DX2)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNYHGRSYGPAPGAGHY-----	44
4 SEQ ID NO: 13 AAC50391.1_белок (312 АК)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNYHGRSYGPAPGAGHY-----	44
5 SEQ ID NO: 14 XM_005249847.3 (изоформа XI)	1	MOME-----	4
6 SEQ ID NO: 15 NM_001362787.2 (изоформа f)	1	M-----	
7 SEQ ID NO: 16 NM_001362785.2	1	MNSP-----	4
8 SEQ ID NO: 17 NM_001326606.2 (изоформа e)	1	MPMY-----	4
9 SEQ ID NO: 18 NM_006303.4	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNYHGRSYGPAPGAGHY-----	44
10 SEQ ID NO: 19 NM_001326609.2		-----	
11 SEQ ID NO: 19 NM_001326610.2		-----	
12 SEQ ID NO: 19 NM_001326611.3		-----	
13 SEQ ID NO: 20 Консенсусная послед-ть		-----	
1 SEQ ID NO: 12 ААН13630 белк. посл. (320 АК)	81	QTPDADLDVYTNIIQADEPTTLTTNALDLNSYLGK-----DYGALKDIIYINAN	127
2 SEQ ID NO: 10 экзон 2	36	QTPDADLDVYTNIIQADEPTTLTTNALDLNSYLGK-----	69
3 SEQ ID NO: 2 NP_001313536.1(DX2)	45	-----Q-----DYGALKDIIYINAN	58
4 SEQ ID NO: 13 AAC50391.1_белок (312 АК)	45	-----Q-----DYGALKDIIYINAN	58
5 SEQ ID NO: 14 XM_005249847.3 (изоформа XI)	5	-----GTAHYKICGQSQGGGLGTPRTVWLEHRORTKLGEDYGALKDIIYINAN	51
6 SEQ ID NO: 15 NM_001362787.2 (изоформа f)	2	-----DYGALKDIIYINAN	14
7 SEQ ID NO: 16 NM_001362785.2	5	-----AVNTLIQSRHG-----DYGALKDIIYINAN	29
8 SEQ ID NO: 17 NM_001326606.2 (изоформа e)	5	-----Q-----DYGALKDIIYINAN	18
9 SEQ ID NO: 18 NM_006303.4	45	-----Q-----DYGALKDIIYINAN	58
10 SEQ ID NO: 19 NM_001326609.2	1	-----DYGALKDIIYINAN	13
11 SEQ ID NO: 19 NM_001326610.2	1	-----DYGALKDIIYINAN	13
12 SEQ ID NO: 19 NM_001326611.3	1	-----DYGALKDIIYINAN	13
13 SEQ ID NO: 20 Консенсусная послед-ть	1	-----DYGALKDIIYINAN	13

Фигура 21А

1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	128	PGSPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	207
2	SEQ ID NO:10 exon2 белк. посл. (320 АК)		-----	
3	SEQ ID NO:2 экзон 2 I3536.1(DX2)	59	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	138
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	59	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	138
5	SEQ ID NO:14 XM_005249f белок (312 АК)	52	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	131
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа XI)	15	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	94
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2_(изоформа f)	30	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	109
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(isoform e)	19	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	98
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4_(изоформа e)	59	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	138
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	14	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	93
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	14	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	93
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	14	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	93
13	SEQ ID NO:20 Consensus Sequence	14	PASPPLSLLVLRLLCEHFRVLYSTVHTHSSVKSYPENLLKCFGEQNKKOPRODYOLGFTLIWKNYPKTOMKFSIQTMCP I	93

## Консенсусная послед-ть

1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	208	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	287
2	SEQ ID NO:10 exon2 белк. посл. (320 АК)		-----	
3	SEQ ID NO:2 экзон 2 I3536.1(DX2)	139	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	218
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	139	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	218
5	SEQ ID NO:14 XM_005249f белок (312 АК)	132	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	211
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа XI)	95	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	174
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2_(изоформа f)	110	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	189
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(isoform e)	99	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	178
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4_(изоформа e)	139	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	218
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	94	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	173
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	94	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	173
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	94	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	173
13	SEQ ID NO:20 Consensus Sequence	94	EGEGNIARFLFSLF60KHNAVYATLIDSHYDIAIFOLKE6SSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADVYVWWSYVLOO	173

## Консенсусная послед-ть

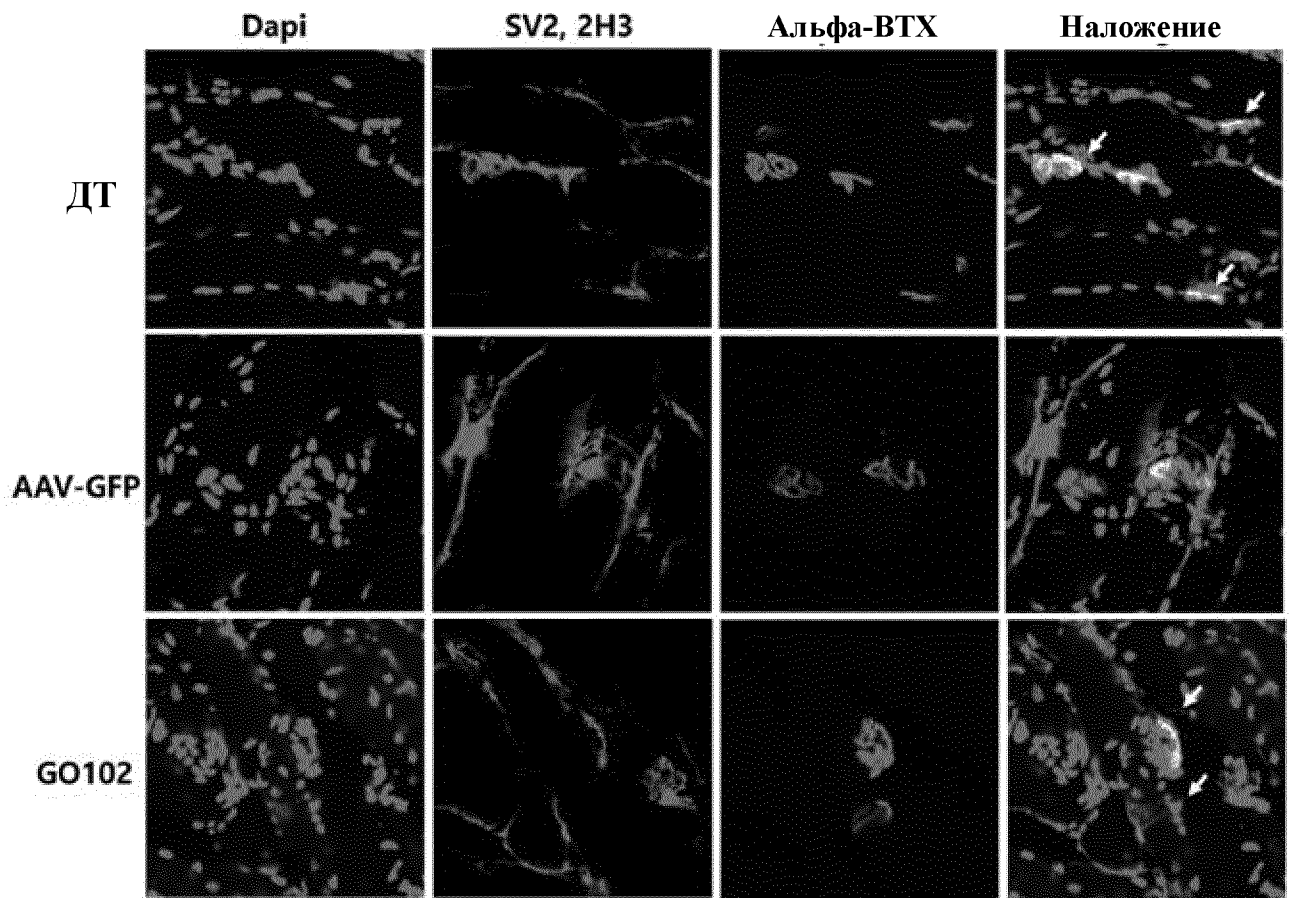
Фигура 21В



### Фигура 21С

<u>1</u> SEQ ID NO:12 ААН13630.1 белк. посл. (320 АК)	288	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	320
<u>2</u> SEQ ID NO:10 экзон 2		-----	
<u>3</u> SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	219	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	251
<u>4</u> SEQ ID NO:13 AAC50391.1_белок (312 АК)	219	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPF-----	243
<u>5</u> SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1)	212	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	244
<u>6</u> SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа f)	175	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	207
<u>7</u> SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	190	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	222
<u>8</u> SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(изоформа e)	179	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	211
<u>9</u> SEQ ID NO:18 NM_006303.4	219	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	251
<u>10</u> SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	174	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
<u>11</u> SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	174	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
<u>12</u> SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	174	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
<u>13</u> SEQ ID NO:20 Консенсусная последовательность	174	IGGCSYTYRPNYQRWMRSCENLAPF-----	198

Фигура 22А



Фигура 22В

