

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390642 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.11

(22) Дата подачи заявки
2021.09.30

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛОДИСТРОФИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ AIMP2-DX2 И, НЕОБЯЗАТЕЛЬНО, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ-МИШЕНИ ДЛЯ miR-142 И ИХ КОМПОЗИЦИЙ

(31) 63/085,922

(32) 2020.09.30

(33) US

(86) PCT/IB2021/059018

(87) WO 2022/070142 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 раскрыты способы лечения возрастной макулодистрофии, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту вектора, содержащего AIMP2-DX2 и, необязательно, последовательность-мишень для miR-142.

A1

202390642

202390642

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛОДИСТРОФИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ AIMP2-DX2 И, НЕОБЯЗАТЕЛЬНО, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ-МИШЕНИ ДЛЯ miR- 142 И ИХ КОМПОЗИЦИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании даты подачи заявки на патент США № 63/085,922, 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 (имя файла: 2493-0005WO01_Sequence Listing_ST25.txt; размер: 28 кб; дата создания: 30 сентября 2021 г.), поданного вместе с настоящей заявкой, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] В настоящей заявке раскрыты способы лечения возрастной макулодистрофии (возрастного заболевания желтого пятна), включающие введение нуждающемуся в этом субъекту вектора, содержащего AIMP2-DX2 и, необязательно, последовательность-мишень для miR-142.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Возрастная макулодистрофия (ВМД) является основной причиной потери зрения в Европе, Соединенных Штатах и Австралии. Признаки ВМД, развивающиеся при течении ее влажной или экссудативной формы, которая характеризуется присутствием друз и CNV (субфовеальной хориоидальной неоваскуляризации), присутствуют у почти двух третей населения старше 80 лет. ВМД является хроническим прогрессирующим заболеванием, характеризующимся поражением центральной зоны сетчатки. Изменения хориокапилляров, пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) и мембраны Бруха (типичные для старения) лежат в основе патогенеза ВМД, однако механизмы, запускающие переход типичных возрастных изменений в патологический процесс, неизвестны. Патологические изменения в ПЭС и сосудистой оболочке приводят к гибели фоторецепторов и необратимой потере зрения. Недавние исследования показали, что в

гибель клеток сетчатки вовлечены не только апоптотические, но и аутофагические и некротические сигнальные каскады (Telegina 2017).

[0005] Различают «сухие» и «влажные» формы данного заболевания. Приблизительно 90% случаев приходится на «сухую» атрофическую форму ВМД; на сегодняшний день не существует метода ее лечения. При «сухой» форме ВМД в области желтого пятна обнаруживаются друзы, происходит перераспределение пигмента, появляются дефекты пигментного эпителия и хориокапиллярного слоя, происходит гибель фоторецепторов на фоне атрофии клеток ПЭС. «Влажная» (экссудативная) форма развивается у ~10% пациентов с ВМД и характеризуется врастанием новообразованных сосудов сквозь дефекты мембраны Бруха под пигментным эпителием сетчатки или под нейроэпителием. Повышенная проницаемость новообразованных сосудов приводит к отеку сетчатки, выделению экссудата и кровоизлиянию в стекловидное тело и сетчатку (что в конечном итоге становится причиной потери зрения).

[0006] В настоящее время модель фотокоагуляции мембраны Бруха, вызванной лазерным излучением, является наиболее распространенной и часто используемой экспериментальной моделью CNV у мышей. Описанная модель представляет собой разрыв мембраны Бруха импульсом лазерного излучения, что приводит к росту новых кровеносных сосудов из сосудистой оболочки в субретинальное пространство и имитирует основные характеристики экссудативной формы ВМД человека, обеспечивая возможность исследования молекулярного механизма CNV посредством использования большой панели трансгенных мышей. Данная модель доказала свою пригодность для проверки эффективности новых лекарственных средств посредством их системного или местного (внутриглазного) введения и продемонстрировала прогностическую ценность в отношении действия данных лекарственных средств у пациентов с ВМД, в частности, на примере ловушки рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) или ацетата анекортава (Telegina 2017).

[0007] Существует три основных лекарственных средства, которые обеспечивают не прямое антиангиогенное действие путем блокирования фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сетчатке. Ранибизумаб (Lucentis, Genentech Inc., Саут-Сан-Франциско, штат Калифорния, США; поставляется на коммерческой основе во всем мире Novartis) одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в 2006 г. для лечения неоваскулярной ВМД (Hernández-Zimbrón 2018). Он представляет собой рекомбинантный гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент (Fab) моноклонального иммуноглобулина (Ig) G1

изотипа каппа, который адресно воздействует на VEGF-A и связывается с ним с высокой аффинностью. Афлиберцепт (Regeneron, Тарритаун, штат Нью-Йорк, США; поставляется на коммерческой основе во всем мире Bayer AG) одобрен FDA в 2011 г. Он представляет собой слитый белок, в котором соединены два ключевых связывающих домена рецепторов VEGF человека 1 и 2 и кристаллизующийся фрагмент (Fc) IgG1 человека. Наконец, бевацизумаб (Genentech Inc., Саут-Сан-Франциско, штат Калифорния, США; поставляется на коммерческой основе во всем мире Roche) представляет собой полноразмерное гуманизованное антитело, связывающее и блокирующее все изоформы VEGF.

[0008] Окислительный стресс может запустить апоптоз, который может активировать и рекрутировать макрофаги и вызывать воспаление. Апоптоз может являться одним из пусковых механизмов воспаления сосудистой оболочки глаза и, следовательно, ангиогенеза в модели CNV (Du 2013).

[0009] 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 ФНО-альфа апоптоз посредством ингибирования убиквитинирования/разрушения TRAF2. Кроме того, имеются сообщения о подтверждении того, что AIMP2-DX2 является индуцирующим фактором существующего рака легких; существующие исследования подтвердили, что AIMP2-DX2, появляющийся в больших количествах в раковых клетках, вызывает рак, препятствуя функциям AIMP2, подавляющим рак. Более того, обнаружено, что появление AIMP2-DX2 в нормальной клетке вызывает прогрессирование злокачественного перерождения клеток, тогда как подавление появления AIMP2-DX2 подавляет рост рака, тем самым демонстрируя лечебные эффекты.

[0010] Кроме того, установлено, что AIMP2-DX2 можно применять для лечения заболеваний нейронов (KR10-2015-0140723 (2017) и US2019/0298858 (2019))

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В настоящей заявке раскрыты способы лечения возрастной макулодистрофии (ВМД) у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2). В некоторых вариантах

реализации ВМД представляет собой влажную ВМД. В некоторых вариантах реализации ВМД представляет собой сухую ВМД.

[0012] Указанный рекомбинантный вектор может дополнительно содержать последовательность-мишень для miR-142.

[0013] Указанный 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.

[0014] Последовательность-мишень для miR-142 может находиться в 3'-направлении от гена AIMP2-DX2.

[0015] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[0016] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[0017] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:10 или 11.

[0018] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10 или 11.

[0019] Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5 (ТССАТАААГТАГГАААСТАСА). В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

[0020] В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит АСТТТА. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG). В некоторых вариантах реализации последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7.

[0021] Последовательность-мишень для miR-142 может повторяться 2 - 10 раз в векторе, описанном в настоящей заявке.

[0022] Указанный вектор может представлять собой вирусный вектор. Указанный 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.

[0023] В некоторых вариантах реализации рекомбинантный вектор вводят местно, путем интравитреальной инъекции, субконъюнктивальной инъекции или в субретинальное пространство субъекта.

[0024] Способы, описанные в настоящей заявке, могут дополнительно включать введение дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой ранибизумаб, афлиберцепт или бевацизумаб.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0025] На Фиг. 1 представлен пример рекомбинантного вектора.

[0026] На Фиг. 2 показана специфичная для нервных клеток экспрессия рекомбинантного вектора в условиях *in vitro*.

[0027] На Фиг. 3 показана последовательность miR142-3pT (мишень) с 4 повторами miR142-3pT (выделены подчеркиванием) (SEQ ID NO:6).

[0028] На Фиг. 4А показано схематическое изображение miR142-3pT с 1х, 2х и 3х повторами и мутантной последовательностью. На Фиг. 4В показано ингибирование экспрессии DX2 с 1х, 2х и 3х повторами miR-142-3pT посредством miR142-3p.

[0029] На Фиг. 5 показано, что коровая связывающая последовательность важна для ингибирования DX2. Вектор с x3 повторами Tseq, демонстрировавший значительное ингибирование DX2 (Фиг. 4B), и конструкт DX2 использовали в качестве контролей. Обработка 100 пмоль miR-142-3p значительно ингибировала вектор Tseq x3, однако ингибирование DX2 и мутантной последовательности не происходило.

[0030] Фиг. 6A - 6C. Сравнение аминокислотных последовательностей AIMP2-DX2 и его вариантов (Фиг. 6b и 6C представляют собой продолжения Фиг. 6A).

[0031] Фиг. 7. Профилактическая эффективность DX2 в модели CNV у мышей. Ангиография с флуоресцеином и ангиография с индоцианином зеленым на участках лазерной фотокоагуляции после обработки scAAV2-GFP и scAAV2-DX2. Через двадцать один день после инъекции вируса вызывали CNV с помощью лазера.

[0032] Фиг. 8. Сравнение площади хориоидальной неоваскуляризации. Отношения площади утечки к площади CNV при обработке контрольным GFP и DX2. Площадь утечки оценивали путем измерения общей площади гиперфлуоресценции с использованием FA, а площадь CNV рассчитывали с использованием ICGA. Изменение площади CNV при обработке DX2. Объем CNV вычисляли на основании общего измеренного объема изолектина B4. Для каждой группы n = 12, *P < (0,05).

[0033] Фиг. 9. Экспрессия VEGF в модели хориоидальной неоваскуляризации (CNV), вызванной лазерным излучением у мышей. Вестерн-блоттинг - результат экспрессии VEGF и кратное изменения уровня VEGF в модели CNV у мышей. Кратное изменение уровня VEGF измеряли с помощью Image J. Для каждой группы n = 6, *P < (0,05).

[0034] Фиг. 10. Гистология поперечного сечения (окрашивание H&E) сетчатки.

[0035] Фиг. 11A-11E. Гистологические измерения гистологической толщины сетчатки. Фиг. 11A. Толщина сетчатки. Фиг. 11B. Толщина ПЭС (пигментного эпителия сетчатки). Фиг. 11C. Толщина ONL (внешнего зернистого слоя фоторецепторов). Фиг. 11D. Толщина наружного сегмента. Фиг. 11E. Толщина OPL (внешнего сплетениевидного слоя). Все образцы получили из среза толщиной 10 мкм, содержащего зрительный нерв. Трансфекция гена DX2 в сетчатку привела к восстановлению общей толщины нейронного слоя сетчатки (Фиг. 11A). Трансфекция DX2 демонстрировала повышенную толщину слоя ПЭС (Фиг. 11B) и слоя наружного сегмента фоторецепторов (Фиг. 11C), что указывает на то, что экспрессия DX2 предотвращает дегенерацию ПЭС и деградацию ресничек фоторецептора. Трансфекция DX2 также демонстрировала повышенную толщину внешнего зернистого слоя фоторецепторов (Фиг. 11D) и внешнего

сплетениевидного слоя (Фиг. 11E), что указывает на то, что экспрессия DX2 снижает дегенерацию фоторецепторов.

[0036] Фиг. 12. Целостность и пролиферация ПЭС (пигментного эпителия сетчатки). Трансфекция гена DX2 приводила к восстановлению целостности ПЭС за счет активации пролиферации ПЭС.

[0037] Фиг. 13. Восстановление PR (фоторецепторов). Трансфекция гена DX2 приводила к восстановлению популяции PR путем активации пролиферации PR.

[0038] Фиг. 14A-14B. Клеточная пролиферация ПЭС и PR. Экспрессию Ki67 измеряли для анализа пролиферации в слоях ПЭС и фоторецепторов. Пролиферация в ПЭС (Фиг. 14A) и слое наружного сегмента фоторецепторов (Фиг. 14B) была значительно выше в образце, трансфицированном AAV2-DX2.

[0039] Фиг. 15A-15F. Функциональное восстановление сетчатки. Электроретинограмма образца, трансфицированного AAV2-DX2, демонстрировала повышенное восстановление нормального формата графика ERG (Фиг. 15A и 15B). Трансфекция AAV2-DX2 демонстрировала повышение амплитуды (Фиг. 15C) и уменьшение задержки а-волн (Фиг. 15D) по сравнению с моделью сухой ВМД (mdm1^{-/-}) или отрицательным контролем (mdm1^{-/-} + AAV-GFP), что указывает на то, что экспрессия DX2 снижала нарушение электрофизиологической функции фоторецепторов и остроты зрения. Образец, трансфицированный AAV2-DX2, характеризовался отсутствием изменений амплитуды (Фиг. 15E) и задержки b-волн (Фиг. 15F).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0040] AIMP2-DX2 представляет собой альтернативный, антагонистический сплайс-вариант AIMP2 (многофункционального белка 2, взаимодействующего с комплексом аминоксил-тРНК-синтазы), который представляет собой мультифакториальный апоптогический ген. Известно, что AIMP2-DX2 подавляет апоптоз клеток, препятствуя функциям AIMP2.

[0041] AIMP2-DX2, действуя как конкурентный ингибитор AIMP2, подавляет апоптоз, опосредованный ФНО-альфа, посредством ингибирования убиквитинирования/разложения TRAF2.

[0042] Кроме того, установлено, что AIMP2-DX2 может лечить заболевания нейронов (US2019/0298858 A1).

[0043] Кроме того, установлено, что при вставке AIMP2-DX2 в аденоассоциированный вирус и внедрении полученного вируса в субретинальное пространство он эффективно ингибирует хориоидальную неоваскуляризацию.

[0044] В настоящей заявке описаны способы лечения возрастной макулодистрофии (ВМД) у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2). В некоторых вариантах реализации ВМД представляет собой влажную ВМД. В некоторых вариантах реализации ВМД представляет собой сухую ВМД.

[0045] В соответствии с настоящим изобретением предложены способы уменьшения просачивания жидкости из сосудов, уменьшения площади хориоидальной неоваскуляризации, уменьшения образования хориоидальной неоваскуляризации или снижения экспрессии VEGF в глазу или области вокруг глаза у субъекта, страдающего ВМД, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

[0046] Рекомбинантные векторы, описанные в настоящей заявке, могут дополнительно содержать последовательность-мишень для miR-142. Указанный 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, промотор синапсина, промотор MeCP2, промотор CaMKII, промотор Hb9 или промотор опсина.

[0047] В некоторых вариантах реализации способов, описанных в настоящей заявке, рекомбинантные векторы могут содержать вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2) и последовательность-мишень для miR-142. Последовательность-мишень для miR-142 может находиться в 3'-направлении от гена AIMP2-DX2. Векторы, описанные в настоящей заявке, могут экспрессировать AIMP2-DX2 в клетках-нейронах, но не в кроветворных клетках, например, лейкоцитах и лимфоидных клетках.

[0048] Полипептид AIMP2-DX2 (SEQ ID NO:2) представляет собой сплайс-вариант AIMP2 (например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; например, нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3), в котором отсутствует второй экзон (SEQ ID NO:10; нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:4) AIMP2. В некоторых

вариантах реализации ген AIMP2-DX2 характеризуется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:1, а полипептид AIMP2-DX2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2. Кроме того, известны варианты или изоформы полипептида AIMP2-DX2, и их могут определить специалисты в данной области техники (см., например, последовательности SEQ ID NO:13 - 19). Например, на Фиг. 6A - 6C показано сравнение AIMP2 (SEQ ID NO:2) и его вариантов, SEQ ID NO:13 - 19, а также консенсусной или коровой последовательности AIMP2 или AIMP2-DX2 (SEQ ID NO:20).

[0049] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, 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 SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или идентичную им на любой диапазон % между указанными значениями. Ген AIMP2-DX2 может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[0050] Ген AIMP2-DX2 может содержать нуклеотидную последовательность, 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 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, или идентичную ей на любой диапазон % между указанными значениями. Ген AIMP2-DX2 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1.

[0051] В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичную SEQ ID NO:10 или 11. В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10 или 11. В некоторых вариантах реализации ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 70%, по меньшей

мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичную SEQ ID NO:4.

[0052] Последовательность-мишень для miR-142 (miR-142T) может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА. Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:5. Например, последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА и совокупность 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 дополнительных нуклеотидов, примыкающих с 5'- или 3'-направления к последовательности АСАСТА, представленной в SEQ ID NO:5.

[0053] Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную, по меньшей мере на 60% идентичную, по меньшей мере на 70% идентичную, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, 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 или на 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA; miR-142-3pT). Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

[0054] Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСТТТА. Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:7. Например, последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, содержащую АСТТТА и совокупность 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дополнительных нуклеотидов, примыкающих с 5'- или 3'-направления к последовательности АСАСТА, представленной в SEQ ID NO:7.

[0055] Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную, по меньшей мере на 60% идентичную, по меньшей мере на 70% идентичную, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, 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 или на 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5pT). Последовательность-мишень для miR-142 может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7.

[0056] Пример мутантной последовательности miR142-3pT представляет собой:

Ccgctgcagtgacagtgccagccaatgtgcagaggtggatgaggtcttgaaaacctggctcctttaacacggccctcaagct ccttaagtgaccagaagcttgctagctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAagat atccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAaaagcttgtagggatccgcc (SEQ ID NO:25).

[0057] Мутантная последовательность относится к одной или более областям, например, четырем областям коровых последовательностей miR142-3pT, замещенных следующим образом: (5'- AACACTAC-3' → 5'-CCACTGCA-3'). При использовании последовательности-мишени miR142-3p x1 повтор (100 пмоль) наблюдали ингибирование экспрессии DX2 в клетках HEK293, трансфицированных вектором; ингибирование экспрессии DX2 посредством miR142-3p также усиливалось при увеличении количества коровых связывающих последовательностей в последовательности-мишени miR142-3p. Вектор, содержащий коровую последовательность Tseq x3, демонстрировал значимое ингибирование, тогда как для мутированной 3x последовательности ингибирования не наблюдали.

[0058] 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., в последовательностях-мишенях микроРНК. МикроРНК могут связываться с транскриптами матричной РНК (мРНК)-мишени генов, кодирующих белок, и подавлять их трансляцию или вызывать разрушение мРНК. В настоящее время выявлено более 2000 микроРНК человека, базы данных miRbase находятся в открытом доступе. Многие микроРНК экспрессируются тканеспецифическим образом и играют важную роль в поддержании тканеспецифических функций и дифференцировки.

[0059] МикроРНК действует на посттранскрипционной стадии экспрессии генов; в случае млекопитающих известно, что микроРНК контролируют экспрессию приблизительно 60% генов. МикроРНК играют важную роль в различных процессах в живом организме; показано, что их эффекты коррелируют 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.

[0060] Последовательность-мишень для miR-142 может находиться в 5'- или 3'-направлении от гена AIMP2-DX2.

[0061] Например, «miR-142-3p» может присутствовать в области, где происходит транслокация ее гена при агрессивном В-клеточном лейкозе; известно, что она экспрессируется в кроветворных тканях (костном мозге, селезенке, тимусе и т. д.) Кроме того, известно, что miR-142-3p участвует в дифференцировке кроветворной системы, ее экспрессия подтверждена в печени эмбриона мыши (кроветворной ткани мыши).

[0062] 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 любое количество раз или диапазон раз между ними.

[0063] В качестве примера, miR-142-3p, например, характеризующаяся нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:23, может содержать соответствующую последовательность-мишень, например, последовательность-мишень miR-142-3p (miR-142-3pT) с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, но не ограничивается ею. MiR-142-5p, например, характеризующаяся нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:24, может содержать соответствующую последовательность-мишень, например, последовательность-мишень miR-142-5p (miR-142-5pT) с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7, но не ограничивается ею.

[0064] В некоторых вариантах реализации miR-142-3p может характеризоваться нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:23, а miR-142-5p может характеризоваться нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:24.

[0065] В настоящем изобретении предложены рекомбинантные векторы, которые могут контролировать побочный эффект сверхэкспрессии варианта AIMP2-DX2 путем инсерции последовательности-мишени miR-142-3p и/или последовательности-мишени miR-142-5p (miR-142-3pT и/или miR-142-5pT, соответственно) в конец AIMP2-DX2 и контроля 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 клетками-нейронами и нервными тканями, в которые выполнили инъекцию, но не присутствовать в кроветворных клетках, не

являющихся нейронами - основной популяции в областях ткани, в которую выполнили инъекцию. MiR142-3p экспрессируется только в кровяных клетках.

[0066] В настоящем изобретении предложены рекомбинантные векторы, содержащие последовательность-мишень miR-142-3p и/или miR-142-5p. В настоящем изобретении 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.

[0067] Термин «рекомбинантный вектор» относится к вектору, который можно экспрессировать в качестве белка-мишени или РНК-мишени в соответствующих клетках-хозяевах, и генетическому конструкту, содержащему необходимый функционально связанный контролирующий фактор для обеспечения возможности надлежащей экспрессии вставленного гена.

[0068] Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-мишень и РНК-мишень для выполнения обычных функций. Например, она может влиять на экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей промотор и белок или РНК, связанные для возможности управления нуклеотидной последовательностью. Функциональную связь с рекомбинантным вектором можно создать с применением технологии рекомбинантных генов, хорошо известной в соответствующей области техники и в которой для сайт-специфического расщепления и соединения ДНК применяют ферменты, общеизвестные в соответствующей области техники.

[0069] 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.

[0070] Указанный рекомбинантный вектор может дополнительно содержать гетерогенный промотор и функционально связанный с указанным промотором гетерогенный ген.

[0071] «Гетерогенный ген» в настоящей заявке может включать белок или полипептид с биологически подходящей активностью и закодированную последовательность

продукта-мишени, например, иммуногена или антигенного белка или полипептида, или белка или полипептида, активируемого обработкой.

[0072] 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, содержащую или не содержащую природный интрон. Кроме того, геномную ДНК можно получить вместе с последовательностью промотора или последовательностью полиаденилирования. Геномную ДНК или кДНК можно получить различными способами. Геномную ДНК можно выделить и очистить из соответствующих клеток с помощью способа, общеизвестного в соответствующей области техники. В качестве альтернативы можно применять мРНК для получения кДНК с помощью обратной транскрипции или другого способа путем выделения из клеток. В качестве альтернативы полинуклеотидная последовательность может содержать последовательность, комплементарную последовательности РНК, например, антисмысловую последовательность РНК, и указанную антисмысловую РНК можно вводить индивиду для подавления экспрессии комплементарного полинуклеотида в клетках индивида.

[0073] 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 из 312 АК: AAC50391.1 или GI: 1215669; вариант из 320 АК: AAN13630.1, GI: 15489023, BC013630.1) описана в литературе (вариант из 312 АК: Nicolaidis, 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 из 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)).

[0074] Термин «сплайс-вариант AIMP2» относится к варианту, полученному в результате частичной или полной утраты экзона 2 из экзонов 1 - 4. Сам по себе этот вариант указывает на нарушение нормальной функции AIMP2 путем образования белка и гетеродимера AIMP2. Введенный путем инъекции ген AIMP2-DX2 редко экспрессируется в тканях, отличающихся от ткани, в которую выполнили инъекцию. Тем не менее, в качестве дополнительной меры безопасности можно вставить последовательность-мишень miR142 для полной блокировки возможности экспрессии

AIMP2-DX2 в кроветворных клетках - основной популяции клеток, не являющихся нейронами, в области ткани, в которую выполнили инъекцию.

[0075] Рекомбинантный вектор может содержать SEQ ID NO:1 и 5.

[0076] Выражение «% гомологии последовательности», «% идентичности» или «идентичный на %» нуклеотидной последовательности или аминокислот можно подтвердить, например, путем сравнения 2 оптимально выровненных последовательностей в домене сравнения, и некоторые из указанных нуклеотидных последовательностей в домене сравнения могут содержать вставку или делецию (т.е. пропуск) по сравнению с эталонной последовательностью (не содержащей вставки или делеции) при оптимальном выравнивании указанных 2 последовательностей.

[0077] Белки, описанные в настоящей заявке, включают не только белки с аминокислотной последовательностью дикого типа, но и белки с вариантами аминокислотной последовательности.

[0078] Варианты белка означают белки с последовательностями, различающимися вследствие делеции, инсерции, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации более чем 1 аминокислотного остатка в природной аминокислотной последовательности. Аминокислотная замена в белке и пептиде, не изменяющая активацию молекулы в целом, известна в данной области техники (H.Neurath, R.L.Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979).

[0079] 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, 2nd Ed., 1989).

[0080] Мутации аминокислот могут происходить на основе относительного сходства заместителей в боковой цепи аминокислот, например, гидрофильности, гидрофобности, электрического заряда и размера, 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 характеризуются сходными размерами; фенилаланин, триптофан и тирозин характеризуются сходной формой. Следовательно, на основании таких соображений аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; и фенилаланин, триптофан и тирозин можно считать функциональными эквивалентами с биологической точки зрения.

[0081] При внедрении одной или более мутаций можно учитывать индекс гидрофобности аминокислоты. Индекс гидрофобности присвоен каждой аминокислоте

в соответствии с ее 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).

[0082] Индекс гидрофобности аминокислоты очень важен при определении такой биологической функции белка, как способность к взаимодействию. Сходной биологической активности можно добиться только в случае выполнения замены на аминокислоту со сходным индексом гидрофобности. В случае введения мутации с учетом индекса гидрофобности выполняют замену между аминокислотами, индексы гидрофобности которых различаются в пределах ± 2 , в пределах ± 1 или в пределах $\pm 0,5$.

[0083] При этом также хорошо известно, что в результате замены между аминокислотами 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 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 ± 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).

[0084] В случае внедрения одной или более мутаций с учетом индексов гидрофильности можно выполнить замену между аминокислотами, индексы гидрофильности которых различаются в пределах ± 2 , в пределах ± 1 или в пределах $\pm 0,5$, но не ограничиваясь ими.

[0085] Аминокислотная замена в белке, не изменяющая 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, включающие 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, известных в соответствующей области техники. Конкретные способы описаны в Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0086] Векторы, описанные в настоящей заявке, можно сконструировать в виде обычных векторов для клонирования или для экспрессии. Кроме того, можно сконструировать векторы, использующие прокариотические или эукариотические клетки в качестве

хозяина. Если вектор представляет собой экспрессирующий вектор и в качестве хозяина используют прокариотическую клетку, то он, как правило, содержит мощный 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*, промотор *T7* и т.д.), сайт связывания рибосом 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 управляющего сайта можно использовать промотор и оператор 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).

[0087] При этом векторы, которые можно применять, могут относиться к более чем одному из типов, например, вирусному вектору, линейной ДНК или плазмидной ДНК.

[0088] «Вирусный вектор» относится к вирусному вектору, способному доставлять ген или генетический материал в желательные клетки, ткань и/или орган.

[0089] Хотя вирусные векторы могут включать более одной из разновидностей, 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 ограничиваются 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.

[0090] 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 широкий диапазон клеток, простоту пролиферации, он может вмещать приблизительно 1 - 7 т.п.о. чужеродного гена и образовывать вирус, неспособный к репликации. Тем не менее, ретровирусы также могут иметь недостатки, включая затруднения при инфицировании клеток после митотического деления, доставке генов в условиях *in vivo* и необходимость пролиферации соматических клеток в условиях *in vitro*. Кроме того, ретровирусы подвержены риску спонтанных мутаций, поскольку они могут встраиваться в протоонкоген, что приводит к возможности некроза клеток.

[0091] В то же время аденовирусы обладают рядом преимуществ в качестве вектора для клонирования, включая репликацию даже в ядре клеток среднего размера, отсутствие клинической токсичности, стабильность даже при вставке чужеродного гена, отсутствие реаранжировки 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, вызывающие гематопозитические, лимфатические заболевания и миелому у человека. Тем не менее, их пролиферация затруднена, поскольку они представляют собой линейную ДНК, и выделить инфицирующий вирус на фоне низкого уровня инфицирования вирусом нелегко. Кроме того, экспрессия доставляемого гена происходит наиболее интенсивно в течение 1 - 2 недель и сохраняется в течение 3 - 4 недель лишь в некоторых клетках. Еще одной проблемой является его высокая иммуногенность.

[0092] Аденоассоциированный вирус (AAV) считается предпочтительным в последние годы, поскольку он позволяет преодолеть вышеупомянутые проблемы и обладает множеством преимуществ в качестве агента для генной терапии. Его также называют аденосателлитным вирусом. Диаметр частицы аденоассоциированного вируса составляет 20 нм, и известно, что он практически не причиняет вреда организму человека. По этой причине в Европе одобрены его продажи в качестве агента для генной терапии.

[0093] AAV представляет собой провирус с одноцепочечным геномом, который нуждается во вспомогательном вирусе для репликации; геном AAV содержит 4680 п.о., которые могут встраиваться в определенную область 19 хромосомы инфицированных клеток. Трансген вставляют в ДНК плазмиды, соединяя с 2 фрагментами последовательностей инвертированных концевых повторов (ИКП) длиной по 145 п.о. и фрагментом сигнальной последовательности. Трансфекцию выполняют вместе с другой плазмидной ДНК, экспрессирующей гены гер и сар AAV, и в качестве вспомогательного вируса добавляют аденовирус. Преимущества AAV состоят в широком диапазоне клеток-хозяев, в которые он доставляет гены, слабых иммунологических побочных эффектах при повторном введении и длительном периоде экспрессии генов. Более того, он безопасен даже при встраивании генома AAV в хромосому клеток-хозяев, и не изменяет или не перестраивает экспрессию генов хозяина.

[0094] Известно, что существует в общей сложности 4 серотипа аденоассоциированного вируса. Наиболее широко исследованным вектором среди серотипов многих

аденоассоциированных вирусов, которые можно использовать для доставки гена-мишени, является аденоассоциированный вирус 2 серотипа, который в настоящее время применяют для доставки генов для терапии муковисцидоза, гемофилии и болезни Канавана. Кроме того, в последнее время возрастает потенциал рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в области генной терапии рака (Du 2013). В некоторых вариантах реализации можно применять аденоассоциированный вирус 2 серотипа. В то же время можно выбрать и применять подходящий вирусный вектор, не ограничиваясь указанным вектором.

[0095] Кроме того, если векторы представляют собой экспрессирующие векторы и используют эукариотические клетки в качестве хозяина, то можно применять промотор, происходящий из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина), или промотор, происходящий из вируса млекопитающих (например, после промотора аденовируса, 7,5 кДа промотор вируса коровьей оспы, промотор SV40, промотор цитомегаловируса и промотор ТК ВПГ). В частности, хотя промотор может включать более 1 разновидности, выбранной из группы, состоящей из промоторов, выбранных из группы, состоящей из ДКП ретровируса, промотора цитомегаловируса (ЦМВ), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора МТ, промотора EF-1-альфа, промотора UB6, промотора бета-актина курицы, промотора CAG, промотора RPE65 и промотора опсина, он не ограничен указанными промоторами. Более того, как правило, вектор содержит последовательность полиаденилирования в качестве последовательности терминации транскрипции.

[0096] Векторы, описанные в настоящей заявке, при необходимости можно объединять с другими последовательностями с целью облегчения очистки белка. Хотя можно использовать гибридную последовательность, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, США), мальтозосвязывающий белок (NEB, США), FLAG (IBI, США) и 6xHis (гексагистидин; Qiagen, США) и т.д., например, она не ограничена перечисленными последовательностями. Кроме того, экспрессирующие векторы могут содержать ген устойчивости к антибиотикам, обычно применяемый в данной области техники в качестве селективного маркера, включая, например, ген устойчивости к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

[0097] Кроме того, в настоящем изобретении описаны носители генов, включая рекомбинантный вектор, содержащий последовательность-мишень (miR-142-3pT и/или miR-142-5pT) miR-142, например, miR-142-3p и/или miR-142-5p, соответственно.

[0098] Термин «перенос генов» в общем случае включает доставку генетического материала в клетки для транскрипции и экспрессии. Этот способ идеально подходит для целей экспрессии белка и лечения. Описан широкий диапазон способов доставки, например, трансфекция ДНК и трансдукция вируса. Это означает опосредованный вирусом перенос генов благодаря возможности адресного воздействия на специфические рецепторы и/или типы клеток с высокой эффективностью доставки и высоким уровнем экспрессии доставленных генов, и, при необходимости, обеспечение безопасности для природы или псевдотипирования.

[0099] Носители генов могут представлять собой объект, трансформированный в рекомбинантный вектор, причем трансформация включает все способы внедрения нуклеиновой кислоты в органический объект, клетки, ткани или органы, и как известно в соответствующей области техники, можно выбрать и использовать подходящую стандартную технологию в зависимости от клеток-хозяев. Хотя такие способы включают электропорацию, слияние протопластов, осаждение с фосфатом кальция (CaPO_4), осаждение с хлоридом кальция (CaCl_2), смешивание с волокнами карбида кремния, трансформацию, опосредованную агробактериями, ПЭГ, сульфатом декстрана и липофектаминол, и т.д., они не ограничены перечисленными способами.

[0100] 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 протеинтирозинфосфатазу, находящуюся на кровяной клетке. Клетки можно идентифицировать по молекулам, находящимся на их поверхности, 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.

[0101] Носители генов могут дополнительно включать носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, разрешенные для применения в фармакологии.

[0102] Кроме того, в настоящем изобретении описаны способы доставки гетерогенного гена в нейрон и экспрессии в нем, которые включают этап внедрения рекомбинантного вектора в соответствующий объект.

[0103] Указанные способы могут повышать экспрессию гетерогенного гена в тканях головного мозга и контролировать экспрессию гетерогенного гена в других тканях.

[0104] Кроме того, в настоящем изобретении описаны векторы, содержащие 1) промотор; 2) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-мишень, связанную с

промотором для обеспечения управления ее экспрессией; и 3) экспрессирующую кассету, содержащую нуклеотидную последовательность, обеспечивающую адресное воздействие miR-142-3p, встроенной в 3'-НТО указанной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации векторы могут содержать 1) промотор; 2) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-мишень, связанную с промотором для обеспечения управления ее экспрессией; и 3) экспрессирующую кассету, содержащую нуклеотидную последовательность, обеспечивающую адресное воздействие miR-142-5p, встроенной в 3'-НТО указанной нуклеотидной последовательности.

[0105] Термин «экспрессирующая кассета» относится к единой кассете, которая может осуществлять экспрессию в целях продукции и секреции белка-мишени, функционально связанного с сигнальным пептидом и расположенного после него, поскольку она содержит ген, кодирующий белок-мишень, и нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор и сигнальный пептид. Секретирующую экспрессирующую кассету можно применять вместе с системой секреции. В такую экспрессирующую кассету или в последовательности, находящиеся за ее пределами, можно включать широкий диапазон факторов, которые могут способствовать эффективной продукции белка-мишени.

[0106] Кроме того, в настоящем изобретении описаны препараты для профилактики или лечения ВМД, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую сплайс-вариант AIMP-2 с утратой экзона 2, и нуклеотидную последовательность, обеспечивающую адресное воздействие miR-142-3p, встроенной в 3'-НТО указанной нуклеотидной последовательности.

[0107] Соответственно, в настоящем изобретении также описаны способы лечения ВМД у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение любого из векторов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации ВМД представляет собой влажную ВМД. В некоторых вариантах реализации ВМД представляет собой сухую ВМД.

[0108] Векторы, описанные в настоящей заявке, могут влиять, без ограничения, на ингибирование апоптоза, снижение выраженности дискинезии и/или ингибирование окислительного стресса, и, следовательно, предотвращать или лечить ВМД.

[0109] Термин «лечение» включает не только полное излечение от ВМД, но также частичное лечение, улучшение и/или уменьшение общих симптомов ВМД в результате применения фармакологического агента, описанного в настоящей заявке.

[0110] Термин «профилактика» означает заблаговременное предотвращение возникновения общих симптомов ВМД путем подавления или блокирования таких симптомов или явлений, как расстройство когнитивных функций, расстройство поведения и разрушение нервов в головном мозге за счет применения фармакологических агентов, описанных в настоящей заявке, у субъекта с дегенеративными расстройствами головного мозга.

[0111] Дополнительно к фармакологическим агентам, описанным в настоящей заявке, можно добавлять адъюванты, не являющиеся активными ингредиентами. Хотя можно применять любой адъювант без ограничений при условии, что он известен в соответствующей области техники, иммунитет можно усилить путем добавления, например, полного и неполного адъюванта Фрейнда.

[0112] Фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, можно производить в формате смеси активных ингредиентов с фармакологически приемлемым носителем. В настоящей заявке фармакологически приемлемый носитель включает носитель, вспомогательное вещество и разбавитель, обычно применяемые в 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.

[0113] Фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, можно применять путем производства в различных форматах, включая формы для перорального введения, например, порошок, гранулу, пилюлю, капсулу, суспендированный раствор, эмульсию, 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 обычными способами их производства.

[0114] При производстве препаратов можно применять разбавители или вспомогательные вещества, например, наполнитель, разбавитель, связующий агент, увлажнитель, разрыхлитель 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 можно производить путем смешивания более чем одного вспомогательного вещества, например, крахмала, карбоната кальция, сахарозы, лактозы и желатина, с

активными ингредиентами. Кроме того, в дополнение к простым вспомогательным веществам можно использовать лубриканты, например, стеарат магния и тальк. Жидкие препараты для перорального введения включают суспендированный раствор, раствор для внутреннего применения, масло и сироп и т. д. с включением различных вспомогательных веществ, например, увлажнителя, подсластителя, вкусоароматической добавки и консерванта и т. д., помимо воды и жидкого парафина, которые являются разбавителями, применяемыми в общем случае. Препараты, не предназначенные для перорального введения, включают стерилизованный водный раствор, неводный растворитель, суспендирующий агент, масло, лиофилизированный агент и суппозиторий. В качестве неводного растворителя и раствора для суспензии можно использовать растительное масло, например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и оливковое масло, и сложные эфиры для инъекций, например, этилат. Агенты для суппозитория могут включать витепсол, твин-61, масло какао, лауриновое масло, глицерожелатин и т. д.

[0115] Фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, можно вводить в объект различными путями. Можно применять все форматы введения, например, пероральное введение и внутривенную, внутримышечную, подкожную и внутрибрюшинную инъекцию.

[0116] В некоторых вариантах реализации рекомбинантный вектор вводят местно, путем интравитреальной инъекции, субконъюнктивной инъекции или в субретинальное пространство субъекта.

[0117] Способы, описанные в настоящей заявке, могут дополнительно включать введение субъекту дополнительного(ых) терапевтического(их) агента(ов). В некоторых вариантах реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой ранибизумаб, афлиберцепт и/или бевацизумаб.

[0118] Желательные дозы для введения терапевтических агентов, описанных в настоящей заявке, зависят от различных факторов, включая способ получения препарата, формат введения, возраст, массу тела и пол пациента, тяжесть симптомов заболевания, диету, период введения, путь введения, скорость выведения, чувствительность реакции и т.д. Тем не менее, их может надлежащим образом выбрать производитель соответствующего лекарственного средства.

[0119] Однако квалифицированный врач может определить и назначить эффективную дозу для целевого лечения в целях достижения лечебного эффекта. Например, лекарственные агенты вводят путем внутривенной, подкожной и мышечной инъекции и инъекции непосредственно 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 5×10^{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 5×10^2 до 5×10^7 клеток/кг в случае клеток. Желательно, чтобы дозы составляли от 0,1 до 10 мг/кг в случае вектора, от 5×10^{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 5×10^3 до 5×10^6 клеток/кг в случае клеток при частоте от 2 до 3 введений в неделю. Строгие ограничения в отношении дозы отсутствуют. Напротив, ее можно менять в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления неврологических расстройств. Эффективная доза других инъекций в подкожный жир и мышцу и для непосредственного введения в пораженную область составляет от 9×10^{10} до $3,3 \times 10^{14}$ частиц рекомбинантного вируса с шагом 10 см при частоте введений 2 - 3 раза в неделю. Строгие ограничения в отношении дозы отсутствуют. Напротив, ее можно менять в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления неврологических расстройств. В частности, фармакологические агенты, описанные в настоящей заявке, могут содержать рекомбинантный аденоассоциированный вирус в количестве от 1×10^{10} до 1×10^{12} гв (геномов вируса)/мл, и, как правило, рекомендуется вводить инъекцию 1×10^{12} гв раз в 2 дня в течение 2 недель. Агент можно вводить 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 500×10^8 гв, от 1×10^8 гв до 100×10^8 гв, от 1×10^8 гв до 10×10^8 гв, например, 5×10^8 гв, или находящейся в любых диапазонах в этих пределах. 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 (множественности заражения).

[0120] В некоторых вариантах реализации векторы, описанные в настоящей заявке, можно вводить субъекту путем, например, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции или субхориоидальной инъекции. Состав для инъекции может быть жидким. В других вариантах реализации векторы, описанные в настоящей заявке, можно вводить субъекту в виде глазных капель или мази.

[0121] Фармакологические препараты можно получить в большом разнообразии форматов для перорального и других путей 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.

[0122] Агенты для перорального введения включают пилюли, таблетки, твердые и мягкие капсулы, жидкость, суспендированный раствор, масла, сироп, 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 магниевую или кальциевую соли и/или полиэтиленгликоль) в дополнение к активным ингредиентам. Кроме того, пилюли могут содержать связующие агенты, например, алюмосиликат магния, крахмальную пасту, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и/или поливинилпирролидон, и, в зависимости от ситуации, могут содержать разрыхлитель, например, крахмал, агар, альгиновую кислоту или ее натриевую соль или аналогичную смесь, и/или абсорбент, краситель, вкусоароматическую добавку и подсластитель. Агенты можно получать обычными способами смешивания, гранулирования или нанесения покрытия.

[0123] 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 диглицериды. Кроме того, в агенте для инъекции можно использовать жирные кислоты, например, олеиновую кислоту.

[0124] Настоящее изобретение будет подробнее рассмотрено с помощью 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

[0125] Большая часть CD45 представляет собой трансмембранную протеинтирозинфосфатазу кровяной клетки, которую можно использовать для идентификации клеток по молекулам на их поверхности. CD45 является маркером всех групп лейкоцитов и В-лимфоцитов. Получен рекомбинантный вектор, специфично экспрессирующийся только в нейронах и не экспрессирующийся в CD45-

положительных клетках, в частности, в клетках лимфоидного и лейкоцитарного происхождения. Указанный рекомбинантный вектор содержит сплайс-вариант, в котором удален 2 экзон многофункционального белка 2, взаимодействующего с комплексом аминоксил-тРНК-синтазы (AIMP2), и микроРНК, способную контролировать экспрессию указанного сплайс-варианта AIMP2.

[0126] Рекомбинантный вектор получали с учетом необходимости обеспечения безопасности при распространении для индукции специфичной экспрессии сплайс-варианта AIMP2 в нервных тканях, в которые выполнили инъекцию. Кроме того, вектор получили таким образом, чтобы полностью блокировать возможность экспрессии AIMP2-DX2 в кроветворных клетках, которые являются основной популяцией клеток, не являющихся нейронами, в области ткани, в которую выполнили инъекцию.

Пример 1-1. Получение варианта AIMP2

[0127] AIMP2 является одним из белков, участвующих в образовании аминоксил-тРНК-синтазы (ARS), и действует как мультифакториальный апоптотический белок. Для конструирования плазмиды, экспрессирующей вариант AIMP2 с удаленным экзоном 2, 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.

[0128] Использовали вариант AIMP2 с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 и аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2.

Пример 1-2. Сортировка микроРНК и выбор ее последовательности-мишени

[0129] Как упоминалось выше, в целях обеспечения безопасности при распространении рекомбинантный вектор получали, как описано выше, предусматривая ограничение экспрессии варианта AIMP2 только в нейронах, получивших инъекцию, и полную блокировку возможности экспрессии AIMP2-DX2 в кроветворных клетках - основной популяции клеток, не являющихся нейронами, в области ткани, в которую выполнили инъекцию.

[0130] Для этой цели в качестве мишени выбрали miR-142-3p, специфически экспрессирующуюся только в кроветворных клетках, образующих лейкоцитарные и лимфоидные клетки. Для получения последовательности, адресно действующей только на miR-142-3p, использовали данные микроматричного анализа В-клеток мыши и

компьютерное моделирование генов, являющихся мишенями miR-142-3p (балльный показатель mirSVR). miR-142-3p представляет собой нуклеотидную последовательность, обозначенную как SEQ ID NO:.. Последовательность-мишень miR-142-3p SEQ ID NO:5 связывается с miR-142-3p

[0131] Последовательность-мишень miR-142-3p содержит последовательность сайтов Nhe I и Hind III, Bmt 1 (ccagaagcttgctagc; SEQ ID NO:21) и последовательность сайта Hind II (aagcttgtag; SEQ ID NO:22). miR-142-3pT может содержать 4 повтора нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, причем указанные повторы соединены линкерами (tcac и gatatc) (Фиг. 4; SEQ ID NO:6).

Пример 1-3. Получение рекомбинантного вектора

[0132] 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 оснований номер 6, и было выполнено путем разрезания и вставки в сайтах Nhe I и Hind III. Рекомбинантный вектор представлен на Фиг. 1.

Пример 2. Подтверждение специфичной для нервных клеток экспрессии рекомбинантного вектора *in vitro*

[0133] Поскольку miR142-3p специфично экспрессируется только в кроветворных клетках, уровень экспрессии варианта AIMP2 подтверждали в специфичных клетках в соответствии с нокдауном варианта AIMP2 и экспрессией последовательности-мишени miR142-3p рекомбинантного вектора.

[0134] В частности, в исследовании использовали группу, не получавшую обработки рекомбинантным вектором (имитация обработки); группу, получившую пустой/контрольный вектор (ОК-вектор); группу, получившую вектор, несущий только вариант AIMP2 (pscAAV_DX2), и группу, получившую рекомбинантный вектор (pscAAV-DX2-miR142-3pT). Концентрация всех векторов представлена в мкг/мкл, каждой группе вводили 2,5 мкл (2,5 мкг). В каждой из экспериментальных групп выполняли обработку клеток линии ТНР-1 (клетки моноцитарного лейкоза человека) и клеток линии SH-SY5Y (нейробластомы) с подтверждением нокдауна варианта AIMP2. Количественную ПЦР выполняли с применением праймеров, представленных ниже в таблице 1 (денатурация в течение 15 секунд, 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 для человека)	8
Обратный	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (только для человека)	9

[0135] В результате подтвердили, что вариант AIMP2 не экспрессируется в группе имитации обработки и группе ОК-вектора. Кроме того, подтвердили наличие экспрессии как в линии клеток THP-1, так и в линии клеток SH-SY5Y в группе, получившей вектор, несущий только вариант AIMP2 (pscAAV-DX2), что подтверждает отсутствие индукции экспрессии, специфичной для нервных клеток. С другой стороны, в группе, получившей рекомбинантный вектор, подтвердили специфичную экспрессию варианта AIMP2 только в линии клеток SH-SY5Y (Фиг. 2).

Пример 3. Материалы и способы

Пример 3-1. Количественная ОТ-ПЦР.

[0136] Общую РНК выделяли из спинного мозга с применением реагента TRIzol (Invitrogen, Уолтем, штат Массачусетс, США), следуя протоколу производителя. Количество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра для количественного анализа (ASP-2680, ACTgene, США). Для получения кДНК выполняли обратную транскрипцию с применением SuperScript III First-Strand (Invitrogen), следуя протоколу производителя. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени, применяя мастер-микс SYBR green PCR master mix (ThermoFisher Scientific, США). Данные об экспрессии, полученные в двух повторностях, использовали для статистического анализа 2-ΔΔCt, экспрессию GAPDH использовали для нормировки.

Пример 3-2. Эксперимент по ингибированию miR142-3p

[0137] Ингибирование экспрессии DX2 за счет miR-142-3p можно было наблюдать для x1 последовательности-мишени miR-142-3p. Временную трансфекцию клеток HEK293 выполняли 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. Ингибирование экспрессии DX2 за счет miR142-3p наблюдали для x1 повтора последовательности-мишени Tseq miR142-3p (Фиг. 4B).

Пример 4.

Пример 4-1. Получили 3 типа векторов для осуществления эффекта ингибирования коровой связывающей последовательности.

[0138] Tseq x1 содержит 1 коровую связывающую последовательность, Tseq x2 содержит 2 коровые связывающие последовательности, а Tseq x3 содержит 3 коровые связывающие последовательности (Фиг. 4A).

[0139] Ингибирование экспрессии DX2 посредством miR142-3p (100 пмоль) начали наблюдать уже для x1 повтора последовательности-мишени miR142-3p. Временную трансфекцию клеток НЕК293 выполняли векторами с x1, x2 и x3 повторами последовательности Tseq miR-142-3p, а также 100 пмоль miR-142-3p с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 ч. Количество мРНК DX2 анализировали с помощью ПЦР. При увеличении количества коровых связывающих последовательностей в последовательности-мишени miR142-3p также усиливалось ингибирование экспрессии DX2 посредством miR142-3p. Вектор, содержащий Tseq x3 в последовательности-мишени, демонстрировал значительное ингибирование (Фиг. 4B).

Пример 4-2. Мутирование коровой последовательности.

[0140] Используя данные микроматричного анализа В-клеток мыши и балльный показатель mirSVR гена-мишени miR-142-3p, предсказали коровую последовательность. Четыре области коровых последовательностей заменяли следующим образом: (5'-AACACTAC-3' → 5'-CCACTGCA-3') (см. исходную последовательность на Фиг. 3 и схему на Фиг. 4A).

Пример 4-3. Коровая связывающая последовательность важна для ингибирования DX2

[0141] Заменяли четыре коровые последовательности (Фиг. 4A). Временную трансфекцию клеток НЕК293 выполняли вектором с DX2 и x3 повторами последовательности-мишени miR-142-3p (Tseq3x) или вектором с мутированной коровой последовательностью (mut), а также 100 пмоль miR-142-3p с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 ч. Экспрессию мРНК DX2 анализировали с помощью ПЦР. Вектор с x3 повторами Tseq,

демонстрировавший значительное ингибирование DX2 (Фиг. 4B), и конструкт DX2 использовали в качестве контроля. Введение 100 пмоль miR142-3p значительно ингибировало вектор с Tseq x3, однако DX2 и мутированная последовательность не подвергались ингибированию (Фиг. 5).

[0142] Пример 5. Модель влажной ВМД у мыши

[0143] Материалы и способы

[0144] 5-1. Эксперименты на животных

[0145] 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) в виварии. Мышей Ocular Sinister (OS, левый глаз) в каждой группе обрабатывали AAV-GFP, а Ocular Dexter (OD, правый глаз) - AAV-DX2. (Инъекция: 5×10^8 гв). Через 1 неделю и 10 недель после субретинальной инъекции воздействовали лазером на слой ПЭС глазного дна с помощью лазерного фотокоагулятора, получая 3-недельную и 3-месячную модель влажной ВМД, соответственно. Через 2 недели, 2 месяца после обработки лазером извлекали глазное яблоко мыши.

[0146] 5-1-1. Субретинальную инъекцию выполняли с использованием следующего протокола.

[0147] Обезболить грызуна. Использовать внутрибрюшинные инъекции 100 мг/мл кетамина и 10 мг/мл ксилазина (20 мкл/10 г массы тела) на фоне ингаляции изофлурана. Убедиться, что животное находится под глубокой анестезией, зажав одну из его лап. Если она вздрагивает, подождать еще несколько минут и повторить попытку, а затем начинать субретинальную инъекцию. Расположить грызуна на боку так, чтобы глаз, подвергаемый инъекции, был обращен к потолку. Под стереомикроскопом осторожно растянуть кожу, чтобы глаз слегка вышел из орбиты (временный проптоз) и стал более доступным; удерживая голову двумя пальцами чуть выше уха и за челюсть, осторожно растянуть кожу параллельно векам, чтобы глаз слегка вышел из орбиты. Стерильной иглой 38 калибра с микронаконечником (INCYTO, KR) сделать отверстие непосредственно под лимбом и под углом во избежание касания хрусталика иглой. Извлечь одноразовую острую иглу из глаза, удерживая хват на голове. Установив заранее заполненный шприц с тупой иглой на микроманипулятор или удерживая его рукой, вставить наконечник шприца с тупой иглой в отверстие, стараясь не касаться хрусталика, и очень аккуратно проталкивать ее через глаз до появления ощущения сопротивления. Выполняя

минимальное количество движений, осторожно и медленно ввести вирусы в субретинальное пространство. AAV2-GFP вводили в OS (левый глаз). AAV2-DX2 вводили с в OD (правый глаз). Медленно извлечь шприц. Нанести увлажняющие глазные капли для поддержания увлажненности глаза. Продолжать непрерывное наблюдение за животным до тех пор, пока оно не восстановит положение лежа на животе.

[0148] 5-1-2. Модель CNV, вызванной лазерным излучением у мыши, получали с использованием следующего протокола.

[0149] Перед воздействием лазера на мышью разместить лазер и щелевую лампу в легкодоступном месте. Включить лазер и установить заранее определенные параметры. Обезболить грызуна. Использовать внутривбрюшинные инъекции 100 мг/мл кетамина и 10 мг/мл ксилазина (20 мкл/10 г массы тела) на фоне ингаляции изофлурана. Перевернуть мышью на бок и поместить каплю (приблизительно 30 мкл) гидрохлорида тетракаина в каждый глаз для местной анестезии. Подождать 2 минуты, пока раствор не подействует.

[0150] Повторно выполнить предыдущий этап, используя одну каплю тропикамида для местного нанесения для расширения зрачков. В качестве альтернативы для расширения использовать гидрохлорид фенилэфрина (2,5%). По истечении соответствующего времени быстро поместить мышью на столик для мыши и поместить столик на опору щелевой лампы для подбородка. Включить щелевую лампу при минимальной яркости света и проверить степень расширения зрачка. Если зрачок недостаточно расширен (приблизительно 2,5-3 мм), вернуть мышью на грелку для животного и подождать. В качестве альтернативы ввести еще одну каплю тропикамида. После достижения достаточной степени расширения глаза приступить к лазерной процедуре.

[0151] Отрегулировать положение мыши на столике для мыши, приведя ее в идеальное положение для визуализации зрительного нерва. Расположить мышью на держателе так, чтобы она лежала горизонтально, перпендикулярно лучу щелевой лампы, с головой по одну сторону и хвостом по другую.

[0152] Слегка повернуть мышью так, чтобы она находилась под углом приблизительно 170°, а голова была ближе к оператору лазера.

[0153] После идеального размещения мыши поместить одну каплю раствора искусственной слезы на покровное стекло размером 25 мм x 25 мм. Поместить одну каплю искусственного раствора слезы на противоположный глаз мыши – это обеспечит увлажнение глаза и поможет задержать образование катаракты.

[0154] Удерживая угол покровного стекла большим и указательным пальцами, расположить его так, чтобы стекло было сжато между кончиками обоих пальцев. Оставшиеся три пальца аккуратно обернуть вокруг тела животного для поддержки и стабилизации рук. Расположить руку так, чтобы покровное стекло можно было легко поместить на глаз мыши. После достижения стабильного положения осторожно прижать покровное стекло (с еще удерживающейся на нем каплей искусственной слезы) к глазу мыши. Убедиться, что покровное стекло расположено как можно перпендикулярнее по отношению к лазерному лучу во избежание рассеяния или отражения лазерного луча. Покровное стекло действует как контактная линза, уплотняя роговицу. Глядя через щелевую лампу, свободной рукой переключить фокус до визуализации сетчатки. Сетчатка имеет светло-желтый/красный цвет в зависимости от визуализируемого местоположения, должны быть видны четкие красные сосуды. Медленно и осторожно манипулировать головой мыши и/или покровным стеклом до визуализации зрительного нерва. Зрительный нерв имеет желтый цвет, от него радиально отходят несколько сосудов. Как только оператор подтвердит визуализацию зрительного нерва, включить фокусирующий луч лазера. После включения лазерного луча переместить фокусирующий луч лазера в нужное положение (приблизительно за 1 диаметр диска от зрительного нерва). Сфокусировать лазерный луч на ПЭС глазного дна. Правильная фокусировка достигается по максимально четкому и яркому лазерному лучу. Если пилотный луч выглядит овальным или не сфокусированным, переключить фокусировку щелевой лампы или переместить покровное стекло. После фокусировки пилотного луча на ПЭС инициировать воздействие лазера с помощью педального переключателя лазера. Отслеживать появление пузырьков сразу после воздействия лазера. Контур лазерного импульса должен быть четким и никоим образом не размытым. Повторно выполнить предыдущие 3 поэтапные действия для всех желательных положений CNV (обычно в положениях на 3, 6, 9 и 12 часов вокруг зрительного нерва).

[0155] Записать в блокнот местоположение и результат воздействия каждого лазерного импульса и результат (успешный, нечеткий, кровоизлияние и т. д.) воздействия каждого импульса для данного глаза. Убедиться, что, когда лазер не используется, он находится в режиме простоя. При необходимости повторно выполнить все предыдущие поэтапные действия для другого глаза мыши, используя противоположную руку для стабилизации и новое покровное стекло. После воздействия всех желательных лазерных импульсов выключить лазер и щелевую лампу.

[0156] Утилизировать покровное стекло и поместить мышь на грелку для восстановления после анестезии. Макроскопически осмотреть глаз на предмет травм и поместить на него каплю раствора искусственной слезы для поддержания увлажнения глаза и профилактики развития катаракты в будущем. Как только мышь оправится от анестезии, вернуть ее в клетку.

[0157] 5-1-3. Ангиография с флуоресцеином

[0158] Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде (Electron Microscopy Sciences, Хатфилд, штат Пенсильвания, США) в течение 2 часов после удаления роговицы и хрусталика. Иссекали задние глазные бокалы ПЭС/сосудистой оболочки/склеры, удаляли стекловидное тело. Глазные бокалы инкубировали в течение ночи при 4°C с изолектином В4, конъюгированным с AlexaFluor 647 или FITC- (1:200, Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), для маркировки прорастающих сосудов сосудистой оболочки.

[0159] 5-1-4. Экспрессия ангиогенного фактора

[0160] Клетки собирали и лизировали в PBS, содержащем 1% Triton X-100. Равные количества белков загружали в лунки геля ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозные мембранные фильтры в течение 2 ч при напряжении 100 В. Мембраны блокировали PBST (физиологический раствор с фосфатным буфером и Tween 20), содержащим 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре, и зондировали антителами против VEGF и бета-актина в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны трижды промывали PBST с последующим инкубированием с вторичным антителом в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех промывок PBST обнаружили полосу с иммунологической реакционной способностью. Данные количественно оценивали с использованием программного обеспечения Image J.

Пример 5-2. Результаты

[0161] Мыши, обработанные scAAV2-DX2, характеризовались ослабленной хориоидальной неоваскуляризацией, вызванной лазерным излучением.

[0162] Хориоидальная неоваскуляризация (CNV), вызванная лазерным излучением, широко используется в модели влажной ВМД у животных. В этой модели для разрушения мембраны Бруха использовали лазер, что позволяло нижележащим сосудам сосудистой оболочки проникать в пространство под пигментным эпителием и расти в нем. 5-недельным самцам мышей C57BL/6 (n = 12) выполняли субретинальную инъекцию scAAV2-GFP (контроль) или scAAV2-DX2 (день 0). Через двадцать один день

после инъекции вызывали CNV с помощью лазерной фотокоагуляции (день 21). Через четырнадцать дней после обработки лазером выполняли ангиографию с флуоресцеином и ИКГ-ангиографию (день 35). На следующий день мышей умертвили, получили плоские препараты сосудистой оболочки и окрасили их изолектином В4, конъюгированным с FITC (Фиг. 7) (день 36). С помощью ангиографии с флуоресцеином ясно наблюдали просачивание жидкости из сосудов, вызванное образованием новых кровеносных сосудов в области фотокоагуляции, вызванной лазерным излучением. ИКГ-ангиографию использовали для получения ангиограммы сосудистой оболочки. Плоские препараты использовали для оценки наличия и площади изолектин-положительной CNV с четкими границами. После инъекции DX2 при ангиографии с флуоресцеином продемонстрировано снижение просачивания жидкости из сосудов по сравнению с контрольной инъекцией GFP (Фиг. 7). Аналогичным образом, мыши, получившие инъекцию DX2, при ИКГ-ангиографии демонстрировали уменьшение площади CNV по сравнению с мышами, получившими инъекцию GFP (Фиг. 7). Кроме того, плоские препараты сосудистой оболочки, окрашенные изолектином-В4, демонстрировали значительное уменьшение областей образования CNV у мышей, получивших инъекцию DX2 (Фиг. 7).

[0163] Отношение площади просачивания к площади CNV оценивали путем измерения общей гиперфлуоресцентной площади с использованием ангиографии с флуоресцеином (FA) и площади CNV с использованием ИКГА (Фиг. 8). Средняя площадь CNV на мембране Бруха при окрашивании изолектином В4 также была значительно меньше у мышей, получивших инъекцию DX2, по сравнению с животными, получившими контрольный GFP (n = 12) (Фиг. 8). На основании этого результата можно сделать вывод, что DX2 оказывал профилактический эффект в модели CNV у мышей.

[0164] Воспалительные клетки, в частности (макрофаги), наблюдались на гистологических препаратах вблизи/внутри очагов ВМД, включая области разрушения мембраны Бруха, атрофии РПЭ и CNV. Показано, что (макрофаги) в очагах CNV секретируют проангиогенные факторы, например, VEGF и провоспалительные цитокины, например, ФНО. На Фиг. 8 показано, что количество воспалительных клеток у мышей, получивших инъекции DX2, было значительно меньшим по сравнению с клетками при CNV с обработкой контрольным GFP.

[0165] Избыточное количество фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) вызывает рост и просачивание жидкости из аномальных кровеносных сосудов под желтым пятном, что приводит к необратимой потере центрального зрения. В этом контексте предпринято

много усилий для разработки антиангиогенных средств для лечения влажной ВМД, мишенью которых является VEGF. Показано, что эти лекарственные средства замедляют прогрессирование ВМД и в некоторых случаях улучшают остроту зрения, подавляя ангиогенез. Авторы настоящего изобретения заранее обрабатывали мышей DX2 до развития хориоидальной неоваскуляризации, вызванной лазерным излучением, и сравнивали их с мышами, получавшими GFP, в отношении экспрессии VEGF (n = 6) (Фиг. 9). Интересно, что мыши, получавшие DX2, демонстрировали меньшую экспрессию по сравнению с мышами, получавшими GFP. Эти данные также продемонстрировали профилактическое действие DX2 на модель CNV у мышей.

Пример 6. Модель сухой ВМД у мышей

[0166] Материалы и способы

[0167] 6-1. Эксперименты на животных

[0168] Для эксперимента на модели сухой ВМД у мышей использовали мышей Mdm1-/- (CRISPR/Cas9 KO), характеризующихся прогрессирующей дегенерацией фоторецепторов и ПЭС, которых можно использовать в качестве модели как для сухой ВМД, так и для наследственной дегенерации сетчатки. 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) в виварии. Инъекцию AAV2-DX2 и отрицательного контроля (AAV2-GFP) в субретинальное пространство выполняли в возрасте 3 недель. Гистологические измерения и оценку функционального восстановления сетчатки выполняли в возрасте 3 месяцев.

[0169] 6-2. Терапевтическое действие DX2 при сухой ВМД и дегенерации сетчатки

[0170] Трехнедельным мышам Mdm1-/- вводили в субретинальное пространство AAV2-DX2/AAV2-GFP в объеме 4 мкл посредством транссклеральной инъекции с использованием стерильной иглы 38 калибра с микронаконечником (INCYTO, KR) для минимизации повреждения сетчатки. Тому же животному вводили AAV2-GFP/DX2. AAV2-GFP вводили в OS (левый глаз). AAV2-DX2 вводили с в OD (правый глаз).

[0171] 6-2-3. Электрофизиологическая оценка функций

[0172] Использовали трехмесячных мышей. Для окончательных измерений оценивали мышей ДТ (n=11), mdm1-/- (n=6), mdm1-/- (AAV2+GFP) (n=6) и mdm1-/- (AAV2+DX2) (n=7).

[0173] Для электроретинограммы с целью оценки функции фоторецепторов использовали OcuScience® HM_sERG. Мышей анестезировали авертином (1%), анестезию поддерживали ингаляцией 3% изофлурана; животных помещали на обогревающую площадку для поддержания их физиологического состояния. Каплю 2% раствора гипромеллозы помещали на контактную линзу для грызунов с встроенным серебряным нарезным электродом для поддержания контакта с роговицей и ее увлажнения. Мышей помещали под купол Ганцфельда диаметром 76 мм для обеспечения темноты и равномерного освещения глаз. Измерения выполняли в соответствии с протоколами стандартов ERG ISCEV-Extended full-field. Данные анализировали с использованием ERGVIEW и выбирали объединенное стандартное значение ответа Rod&Cone для анализа при интенсивности вспышки 3000 мкд/см², 0,10 Гц. Анализ а-волн выполняли для оценки функции фоторецепторных клеток. Анализ b-волн выполняли для оценки функции биполярных и горизонтальных клеток. Анализировали значения амплитуды и задержки для а-волн и b-волн.

[0174] 6-2-4. Гистологические измерения

[0175] Всех мышей умерщвляли после ERG и извлекали их глазные яблоки. Глазные яблоки фиксировали в 4% ПФА в течение ночи при 4°C. Глазные яблоки обезвоживали в 30% сахарозе и заключали в среду OCT для получения криосрезов ткани. Получали криосрезы всех образцов сетчатки из среза толщиной 10 мкм, содержащего зрительный нерв.

[0176] Выполняли анализ криосрезов сетчатки. Для анализа толщины слоя использовали окрашивание H&E. Анализ толщины слоя выполняли с помощью программы Leica LAS. Иммунофлуоресценцию использовали для оценки экспрессии RPE65 и опсина и пролиферации (Ki67). Задание исследуемых областей для иммунофлуоресценции и измерения коэффициента перекрытия выполняли с помощью Image J.

[0177] 6-2-5. Статистический анализ

[0178] Для первичного анализа использовали t-критерий Стьюдента. Значения Р сравнивали с mdm1^{-/-}(AAV2+DX2). Для оценки степени восстановления значения Р сравнивали с ДТ. Для получения полных данных рассчитывали критерий однородности дисперсии Левена, критерии ANOVA и апостериорную оценку (по Даннету (Т3), Тьюки HSD) с помощью IBM SPSS statistics 23.

[0179] 6-2-6. Результаты.

[0180] На Фиг. 10 показана гистология поперечного сечения (окрашивание H&E) сетчатки.

[0181] На Фиг. 11А-11Е показаны гистологические измерения толщины сетчатки. На Фиг. 11А показана толщина сетчатки. На Фиг. 11В показана толщина ПЭС (пигментного эпителия сетчатки). На Фиг. 11С показана толщина ONL (внешнего зернистого слоя фоторецепторов). На Фиг. 11D показана толщина наружного сегмента. На Фиг. 11Е показана толщина OPL (внешнего сплетениевидного слоя). Все образцы получили из среза толщиной 10 мкм, содержащего зрительный нерв. Трансфекция гена DX2 в сетчатку привела к восстановлению общей толщины нейронного слоя сетчатки (Фиг. 11А). Трансфекция DX2 демонстрировала повышенную толщину слоя ПЭС (Фиг. 11В) и слоя наружного сегмента фоторецепторов (Фиг. 11С); это означает, что экспрессия DX2 предотвращала дегенерацию ПЭС и деградацию ресничек фоторецептора. Трансфекция DX2 также демонстрировала повышенную толщину внешнего зернистого слоя фоторецепторов (Фиг. 11D) и внешнего сплетениевидного слоя (Фиг. 11Е), что указывает на то, что экспрессия DX2 снижает дегенерацию фоторецепторов.

[0182] На Фиг. 12 изображена целостность и пролиферация ПЭС (пигментного эпителия сетчатки). Трансфекция гена DX2 приводила к восстановлению целостности ПЭС за счет активации пролиферации ПЭС.

[0183] На Фиг. 13 показано восстановление PR (фоторецепторов). Трансфекция гена DX2 приводила к восстановлению популяции PR путем активации пролиферации PR.

[0184] На Фиг. 14А-14В показана клеточная пролиферация ПЭС и PR. Экспрессию Ki67 измеряли для анализа пролиферации в слоях ПЭС и фоторецепторов. Пролиферация в ПЭС (Фиг. 14А) и слое наружного сегмента фоторецепторов (Фиг. 14В) была значительно выше в образце, трансфицированном AAV2-DX2.

[0185] На Фиг. 15А-15D показано функциональное восстановление сетчатки. Трансфекция AAV2-DX2 демонстрировала повышение амплитуды (Фиг. 15А) и уменьшение задержки а-волн (Фиг. 15В) по сравнению с моделью сухой ВМД (mdm1-/-) или отрицательным контролем (mdm1-/- + AAV-GFP), что указывает на то, что экспрессия DX2 снижала нарушение электрофизиологической функции фоторецепторов и остроты зрения. Образец, трансфицированный AAV2-DX2, не демонстрировал изменения амплитуды b-волн (Фиг. 15С), но характеризовался уменьшением задержки (Фиг. 15D) по сравнению с моделью сухой ВМД (mdm1-/-); это указывает на то, что DX2 влияет только на ПЭС и фоторецепторы, но не на биполярные клетки (постфоторецепторные нейроны).

[0186] Электроретинограмма образца, трансфицированного AAV2-DX2, демонстрировала повышенное восстановление нормального формата графика ERG (Фиг. 15А и 15В). Образец, трансфицированный AAV2-DX2, демонстрировал слегка увеличенную амплитуду а-волн (Фиг. 15С), а также уменьшение задержки (Фиг. 15D) по сравнению с моделью сухой ВМД (*mdm1*^{-/-}); это указывает на то, что экспрессия DX2 снижала нарушение электрофизиологической функции фоторецепторов. Образец, трансфицированный AAV2-DX2, характеризовался отсутствием изменений амплитуды b-волн (Фиг. 15Е), однако демонстрировал уменьшение задержки (Фиг. 15F) по сравнению с моделью сухой ВМД (*mdm1*^{-/-}).

[0187] СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

KR 10-1067816 (2011).

Telegina, D. V., O. S. Kozhevnikova, and N. G. Kolosova. "Molecular mechanisms of cell death in retina during development of age-related macular degeneration." *Advances in Gerontology* 7.1 (2017): 17-24.

Hernández-Zimbrón, Luis Fernando, et al. "Age-related macular degeneration: new paradigms for treatment and management of AMD." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018 (2018).

Du, Hongjun, et al. "JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.6 (2013): 2377-2382.

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 be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state, *Nature Biotech.* 25:12457-1467 (2007).

[0188] Предшествующее описание конкретных вариантов реализации настолько полно раскрывает общую природу настоящего изобретения, что другие могут, применяя знания в рамках компетенции специалистов в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать его для различных вариантов применения, не отклоняясь от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, предполагается, что такие адаптации и модификации подпадают под значение и входят в диапазон эквивалентов описанных вариантов реализации, на основании представленных в настоящей заявке информации и указаний. Следует понимать, что используемая в настоящей заявке фразеология или терминология предназначена для описания, а не ограничения, так что

квалифицированный специалист в данной области техники должен интерпретировать терминологию или фразеологию настоящего описания в свете указанной информации и указаний.

[0189] Широта и сущность настоящего изобретения не должны ограничиваться ни одним из вышеописанных типичных вариантов реализации, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

[0190] Все различные аспекты, варианты реализации и варианты, описанные в настоящей заявке, можно комбинировать всевозможными способами.

[0191] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент отдельно включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Способ лечения возрастной макулодистрофии (ВМД) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту фармацевтически эффективного количества рекомбинантного вектора, содержащего вариант гена AIMP2 с удаленным экзоном 2 (AIMP2-DX2).

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная ВМД представляет собой влажную ВМД.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная ВМД представляет собой сухую ВМД.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный вектор дополнительно содержит последовательность-мишень для miR-142.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2.

6. Способ по п. 5, 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.

7. Способ по любому из пп. 4-6, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 расположена в 3'-направлении от гена AIMP2-DX2.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный ген AIMP2-DX2 не содержит экзон, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:10 или 11.

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

12. Способ по любому из пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит АСАСТА.

13. Способ по пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит АСАСТА и 1 - 17 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:5.

14. Способ по любому из пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA).

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

16. Способ по любому из пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит АСТТТА.

17. Способ по пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит АСТТТА и 1 - 15 дополнительных смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:7.

18. Способ по любому из пп. 4-11, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность,

по меньшей мере на 50% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG).

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7.

20. Способ по любому из пп. 4-19, отличающийся тем, что указанная последовательность-мишень для miR-142 повторяется 2 - 10 раз.

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

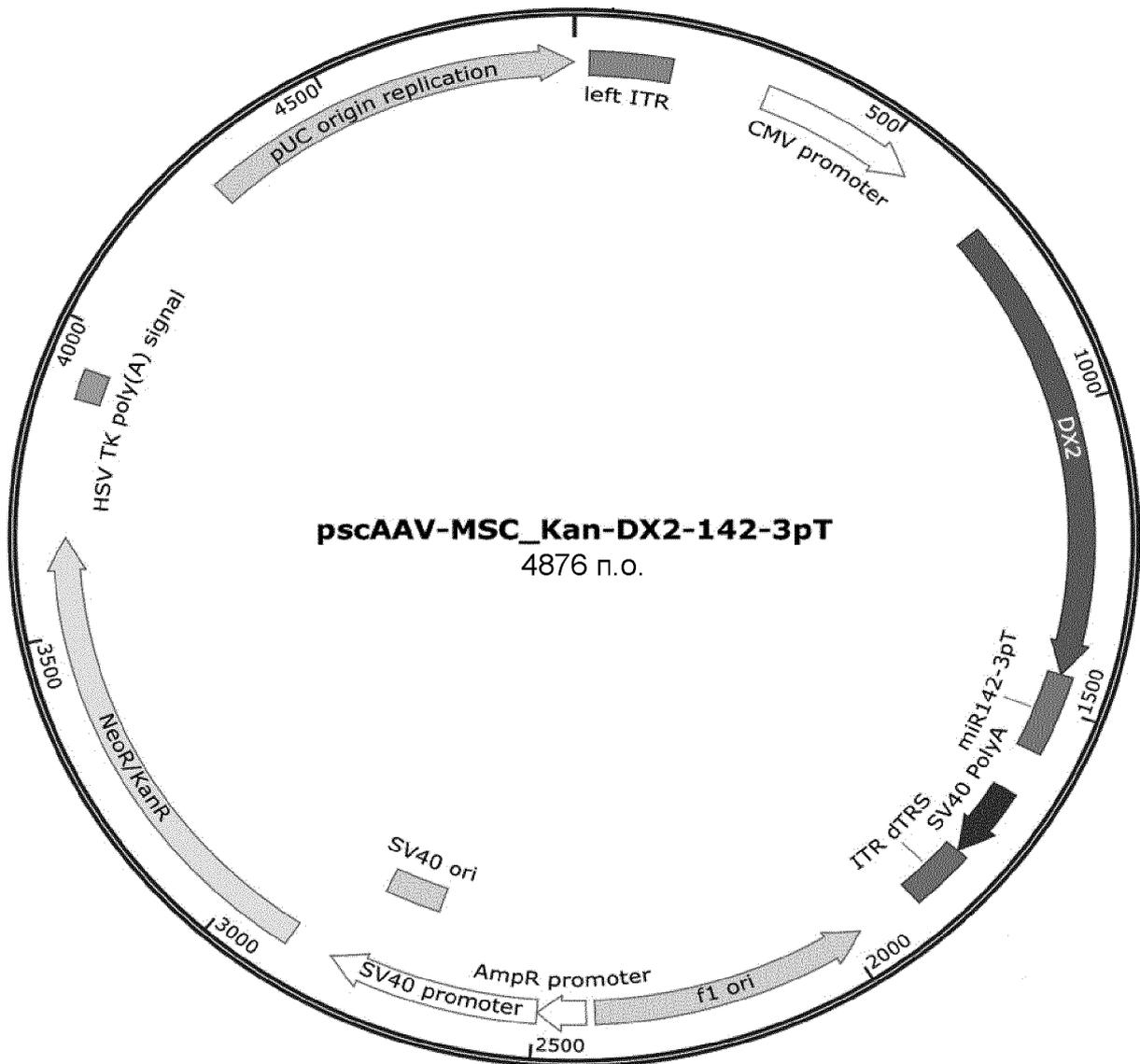
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса лейкоза мышей (MLV), вируса саркомы/лейкоза птиц (ASLV), вируса некроза селезенки (SNV), вируса саркомы Рауса (RSV), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вируса коровьей оспы или вируса простого герпеса.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что рекомбинантный вектор вводят местно, путем интравитреальной инъекции, путем субконъюнктивальной инъекции или в субретинальное пространство указанного субъекта.

24. Способ по любому из пп. 1-23, дополнительно включающий введение указанному субъекту дополнительного терапевтического агента.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ранибизумаб, афлиберцепт или бевацизумаб.

ФИГ. 1



left ITR - левый ITR

CMV promoter - Промотор ЦМВ

ITR dTRS - ИКП dTRS

AmpR promoter - Промотор AmpR

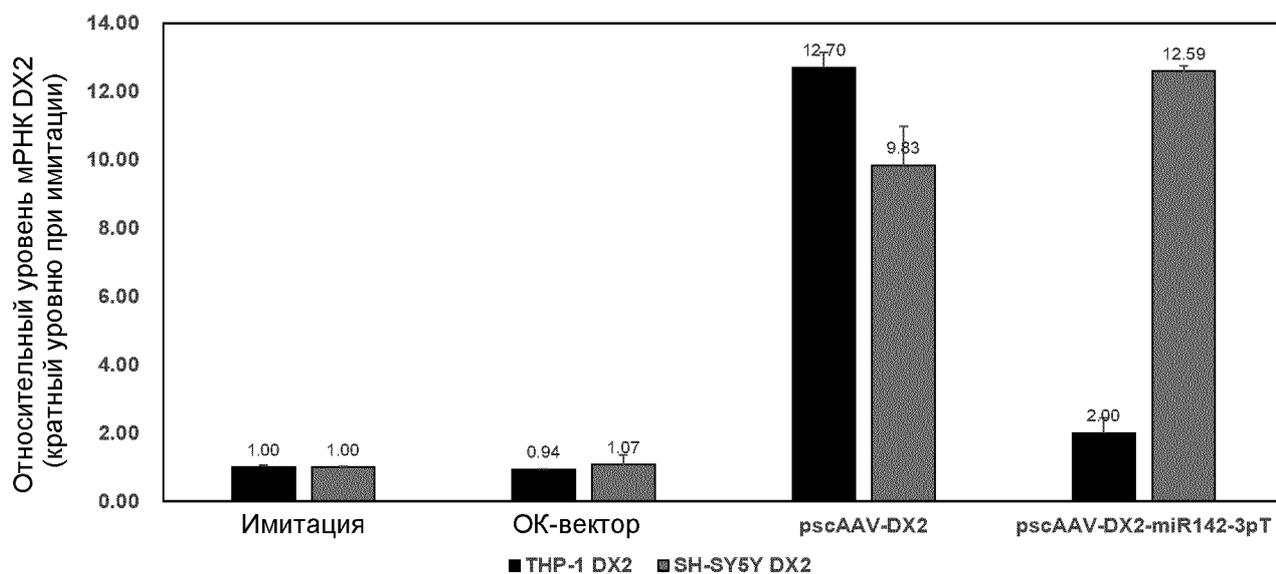
SV40 promoter - Промотор SV40

HSV TK poly(A) signal - Поли(А)-сигнал ТК ВПГ

pUC origin replication - Сайт инициации репликации pUC

ФИГ. 2

Нокаун экспрессии DX2 посредством miR142-3pT



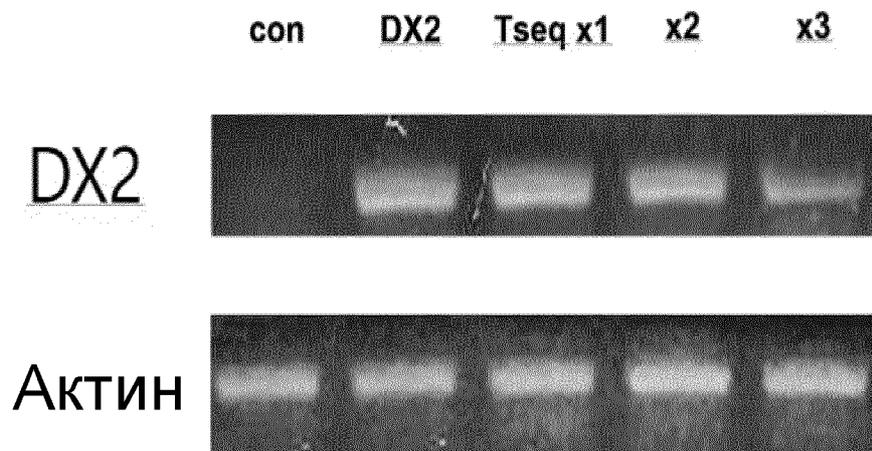
ФИГ. 3

ccagaagcttgctagctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacacta
 cagatatctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacaaagctt
 gtag

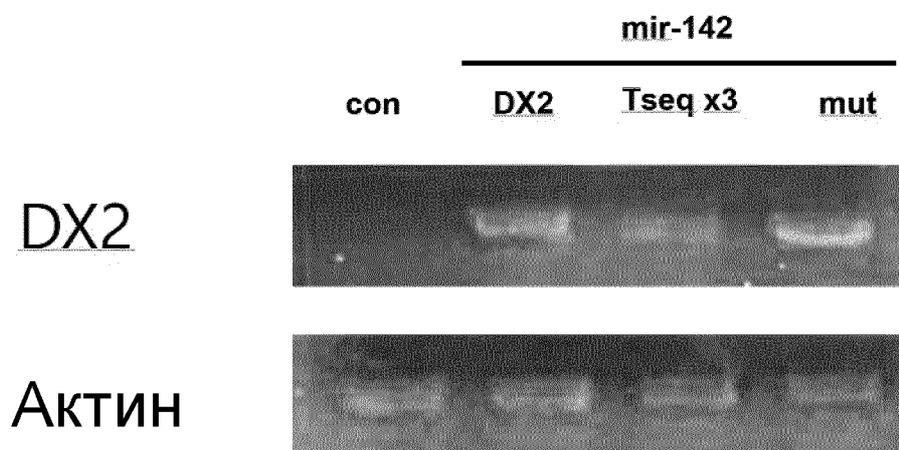
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 5



ФИГ. 6А

1 SEQ ID NO:12 ААН13630.1 посл. белка (320 АК)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRYELPTCMYRLPNYHGGRSYGPAPGAGHYQEE SNLSLOALESRQDD ILKRLYELKAAVDGLSKMI	80
2 SEQ ID NO:10 экзон2	1	-----EESNLSLOALESRQDD ILKRLYELKAAVDGLSKMI	35
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRYELPTCMYRLPNYHGGRSYGPAPGAGHY-----	44
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Белок_(312 АК)	1	MPMYQYKPYHGGGAPLRYELPTCMYRLPNYHGGRSYGPAPGAGHY-----	44
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1)	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	MPMYQYKPYHGGGAPLRYELPTCMYRLPNYHGGRSYGPAPGAGHY-----	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 последовательность		-----	
1 SEQ ID NO:12 ААН13630.1 посл. белка (320 АК)	81	QTPDADLDYTNIIQADEPTLTTNALDLNSYLGK-----DYGALKDIYINAN	127
2 SEQ ID NO:10 экзон2	36	QTPDADLDYTNIIQADEPTLTTNALDLNSYLGK-----	69
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	45	-----Q-----DYGALKDIYINAN	58
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Белок_(312 АК)	45	-----Q-----DYGALKDIYINAN	58
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1)	5	-----GTAHYKICGQSQGGGLGTPRTYWLEHRQRTKLGEDYDYGALKDIYINAN	51
6 SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа f)	2	-----DYGALKDIYINAN	14
7 SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	5	-----AYNTLIQSRHG-----DYGALKDIYINAN	29
8 SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(изоформа e)	5	-----Q-----DYGALKDIYINAN	18
9 SEQ ID NO:18 NM_006303.4	45	-----Q-----DYGALKDIYINAN	58
10 SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	1	-----DYGALKDIYINAN	13
11 SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	1	-----DYGALKDIYINAN	13
12 SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	1	-----DYGALKDIYINAN	13
13 SEQ ID NO:20 Консенсусн. последовательность	1	-----DYGALKDIYINAN	13

ФИГ. 6В

1 SEQ ID NO:12 ААН13630.1 посл. белка (320 АК) 128	PGSPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	207
2 SEQ ID NO:10 экзон2	-----	
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2) 59	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	138
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Белок_(312 АК) 59	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	138
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1) 52	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	131
6 SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа f) 15	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	94
7 SEQ ID NO:16 NM_001362785.2 30	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	109
8 SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(изоформа e) 19	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	98
9 SEQ ID NO:18 NM_006303.4 59	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	138
10 SEQ ID NO:19 NM_001326609.2 14	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	93
11 SEQ ID NO:19 NM_001326610.2 14	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	93
12 SEQ ID NO:19 NM_001326611.3 14	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	93
13 SEQ ID NO:20 Консенсусн. последовательн. 14	PASPPLSLLYLHRLLCHEFRVLSYVHTHSSYKSYNPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTL IWKVNPKTOMKFSIQTMCP I	93
1 SEQ ID NO:12 ААН13630.1 посл. белка (320 АК) 208	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	287
2 SEQ ID NO:10 экзон2	-----	
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2) 139	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	218
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Белок_(312 АК) 139	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	218
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1) 132	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	211
6 SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа f) 95	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	174
7 SEQ ID NO:16 NM_001362785.2 110	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	189
8 SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(изоформа e) 99	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	178
9 SEQ ID NO:18 NM_006303.4 139	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	218
10 SEQ ID NO:19 NM_001326609.2 94	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	173
11 SEQ ID NO:19 NM_001326610.2 94	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	173
12 SEQ ID NO:19 NM_001326611.3 94	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	173
13 SEQ ID NO:20 Консенсусн. последовательн. 94	EGEGNIARFLFSLFGQKHNAVYATLIDSWYDIAIFQLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTYADYVYLWVYLQO	173

ФИГ. 6С

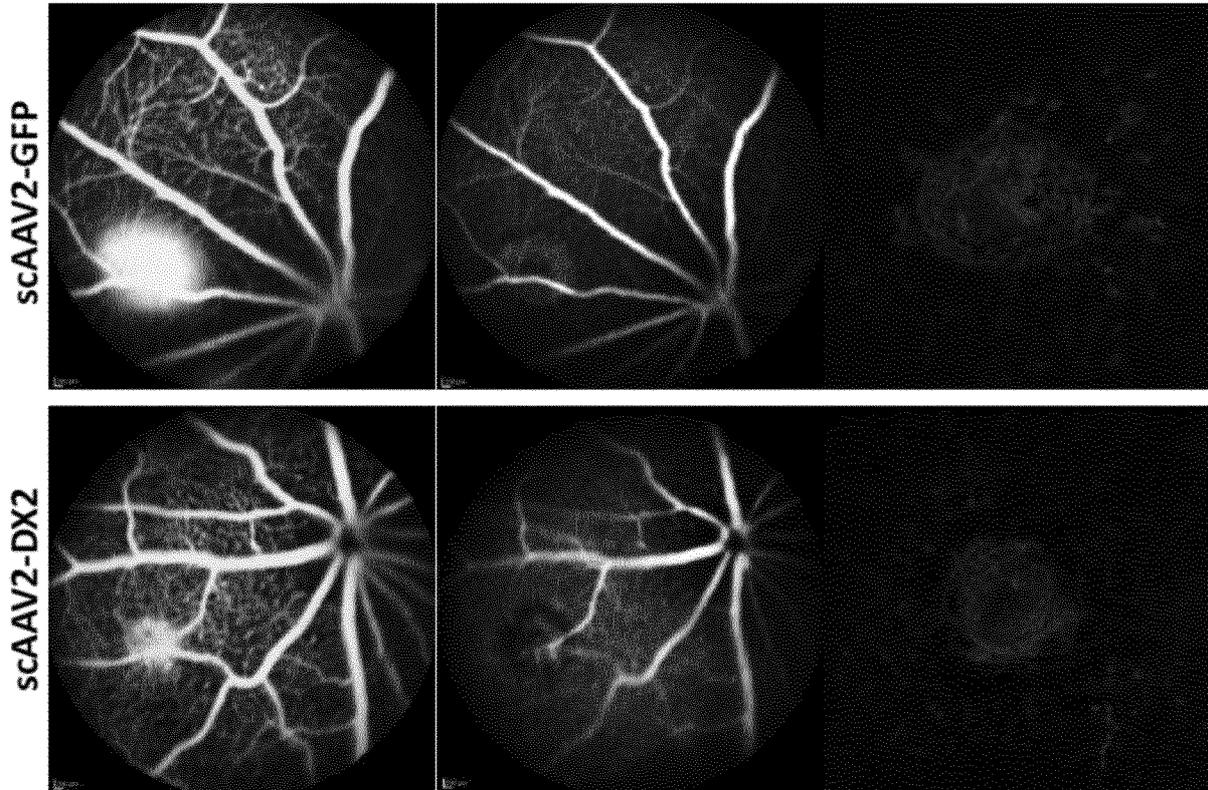
1 SEQ ID NO:12 AAH13630.1 посл. белка (320 АК)	288	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	320
2 SEQ ID NO:10 экзон2		-----	
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	219	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	251
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Белок_(312 АК)	219	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPF-----	243
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(изоформа X1)	212	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	244
6 SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(изоформа f)	175	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	207
7 SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	190	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	222
8 SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(изоформа e)	179	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	211
9 SEQ ID NO:18 NM_006303.4	219	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	251
10 SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	174	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	206
11 SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	174	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	206
12 SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	174	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPFNTALKLLK	206
13 SEQ ID NO:20 Консенсусн. последовательность	174	IGGCSYTPANYQR#MRSCENLAPF-----	198

ФИГ. 7

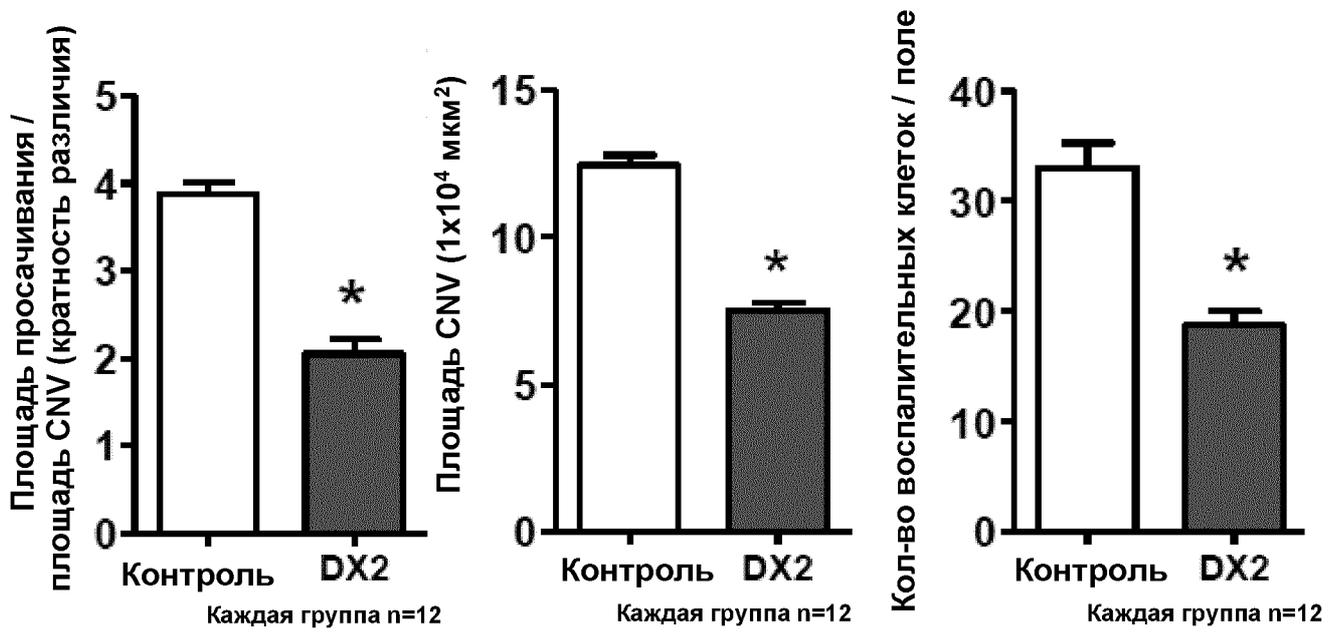
Ангиография с флуоресцеином

ИКГ-ангиография

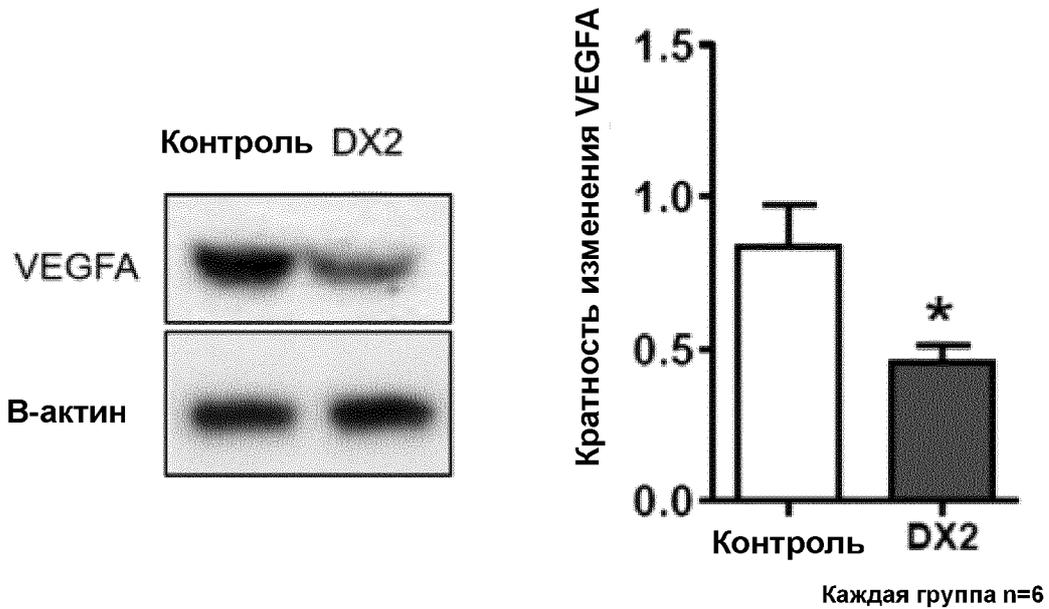
Изолектин В4



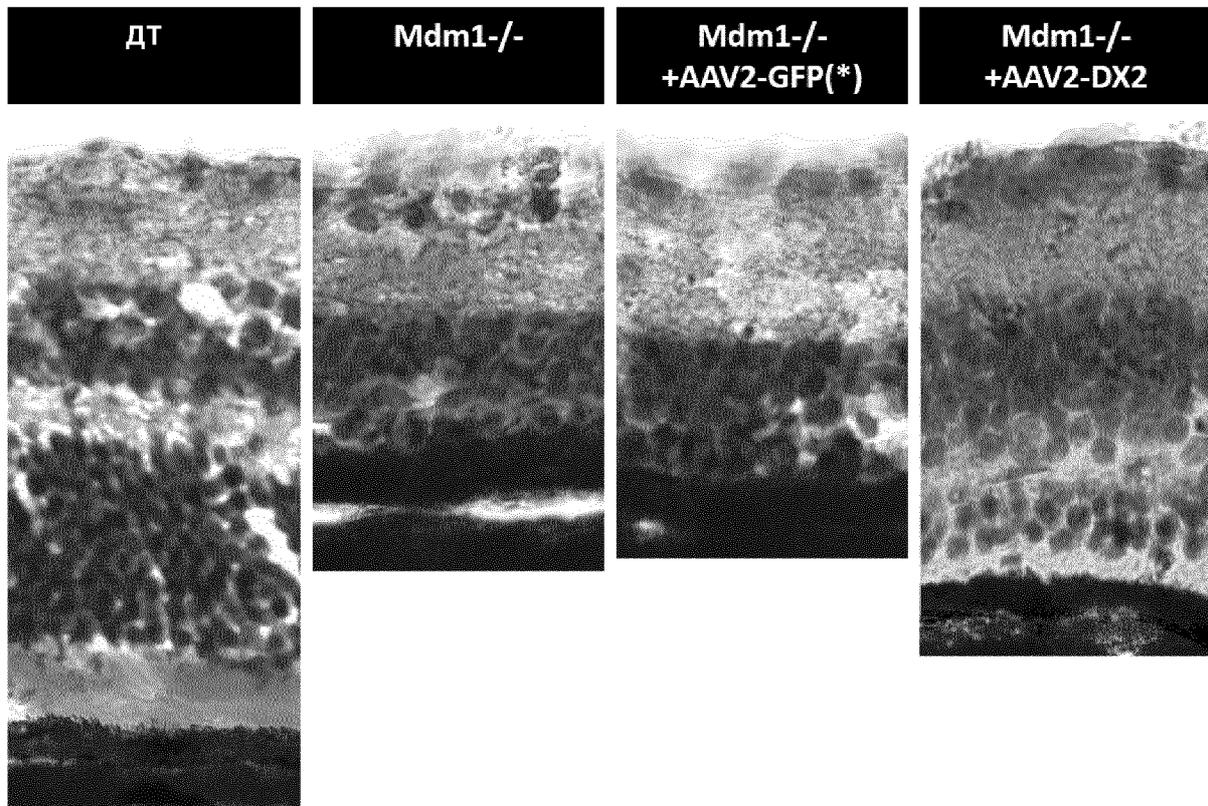
ФИГ. 8



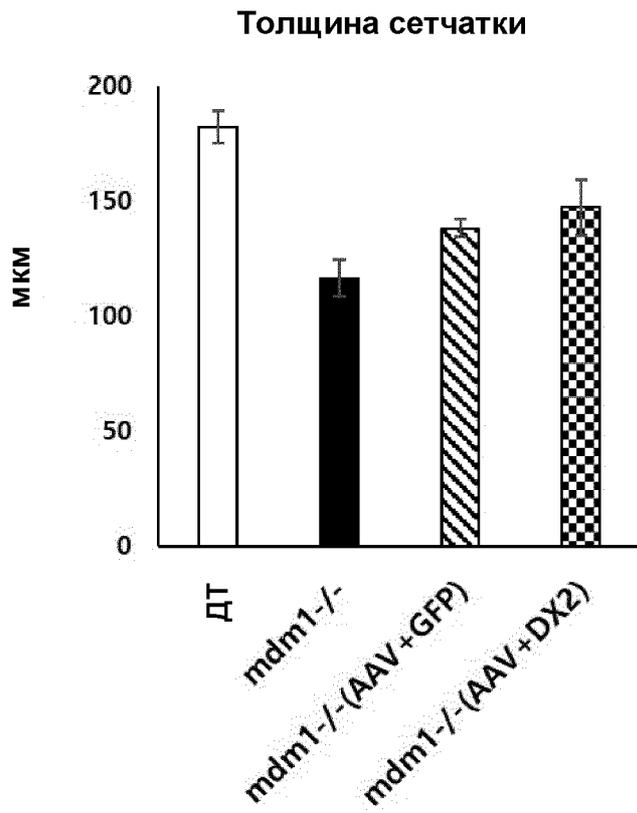
ФИГ. 9



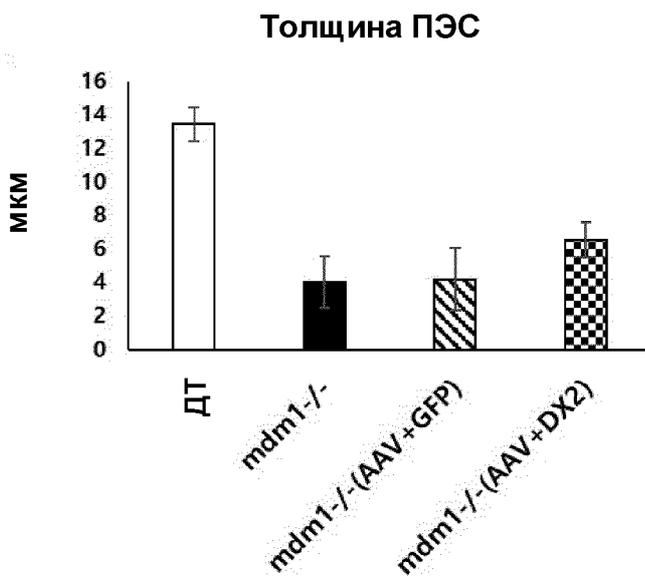
ФИГ. 10



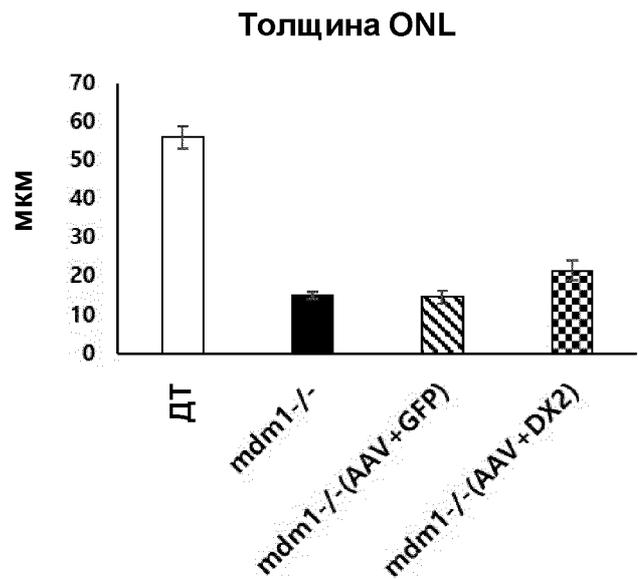
ФИГ. 11А



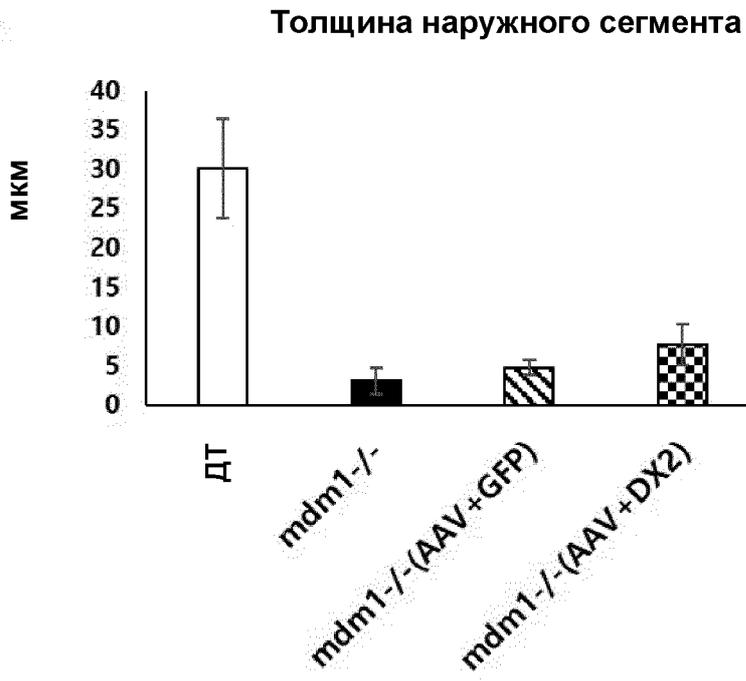
ФИГ. 11В



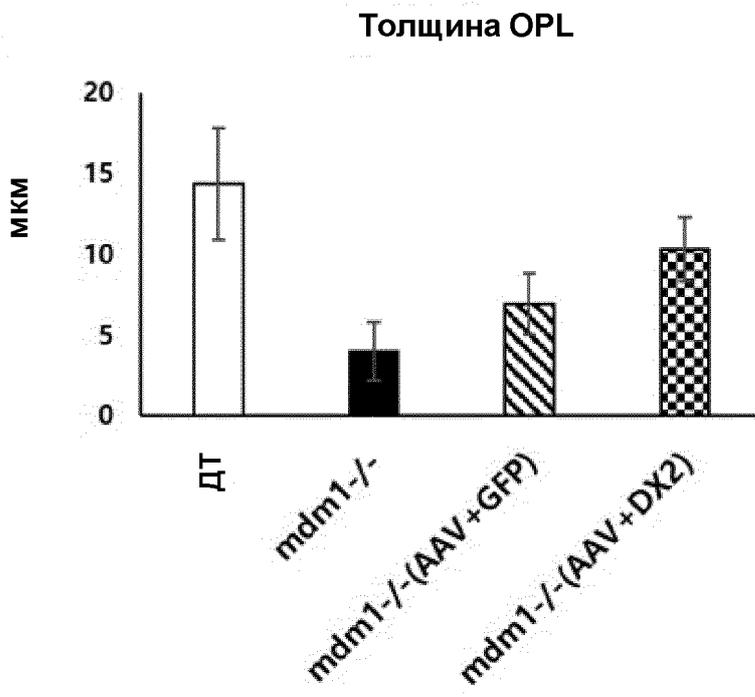
ФИГ. 11С



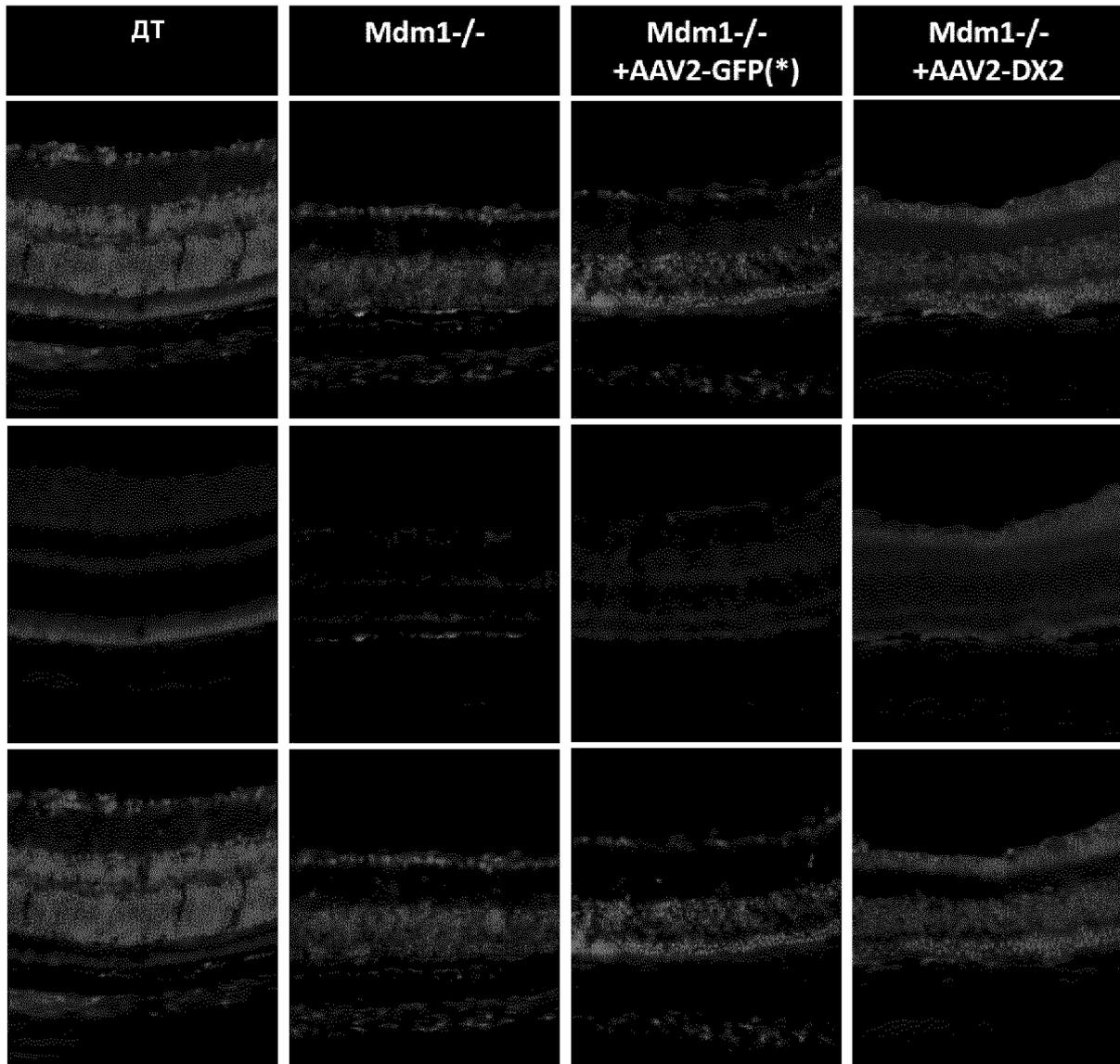
ФИГ. 11D



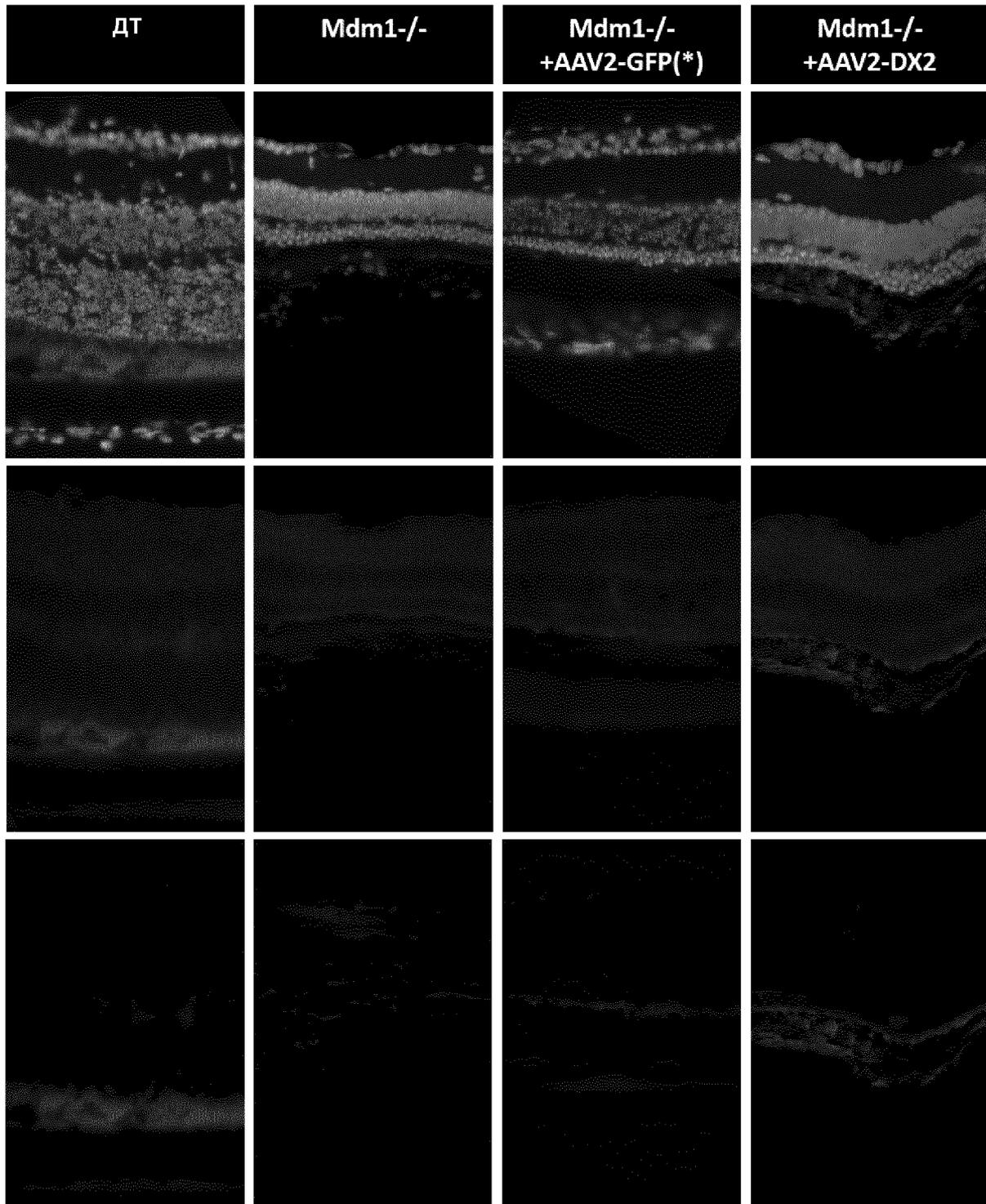
ФИГ. 11Е



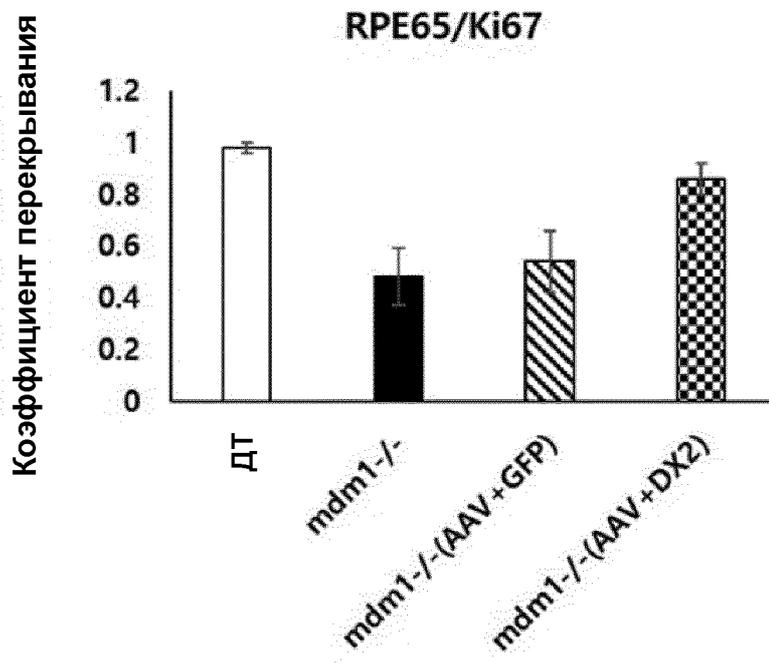
ФИГ. 12



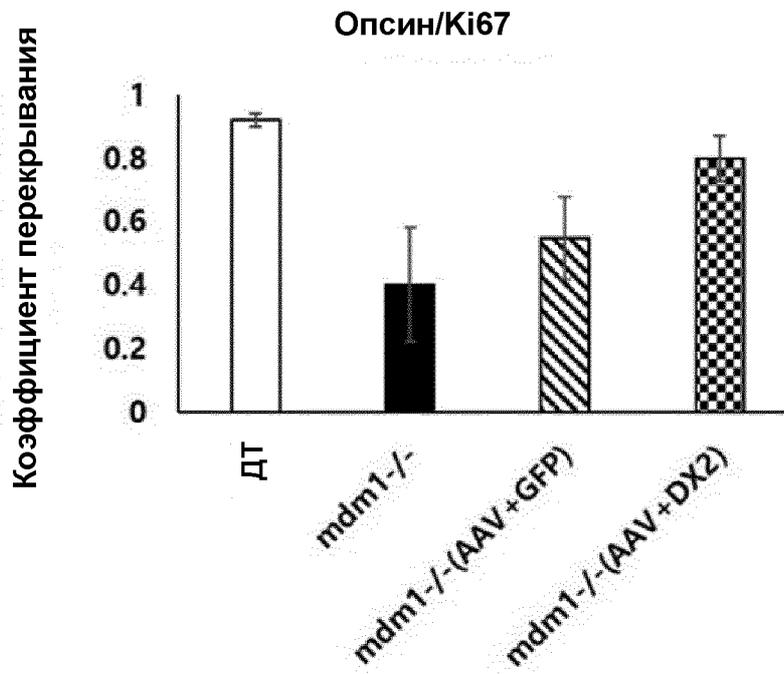
ФИГ. 13



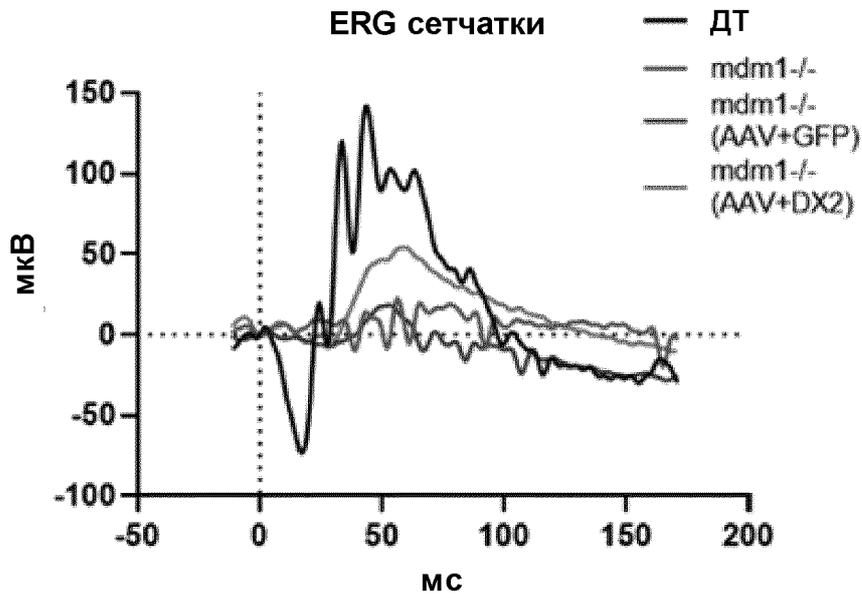
ФИГ. 14А



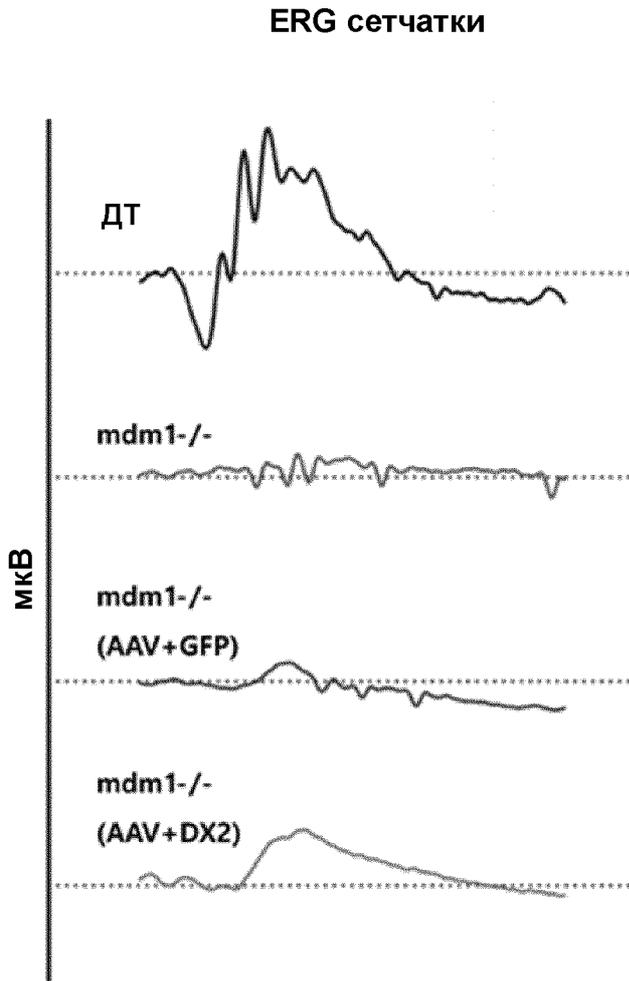
ФИГ. 14В



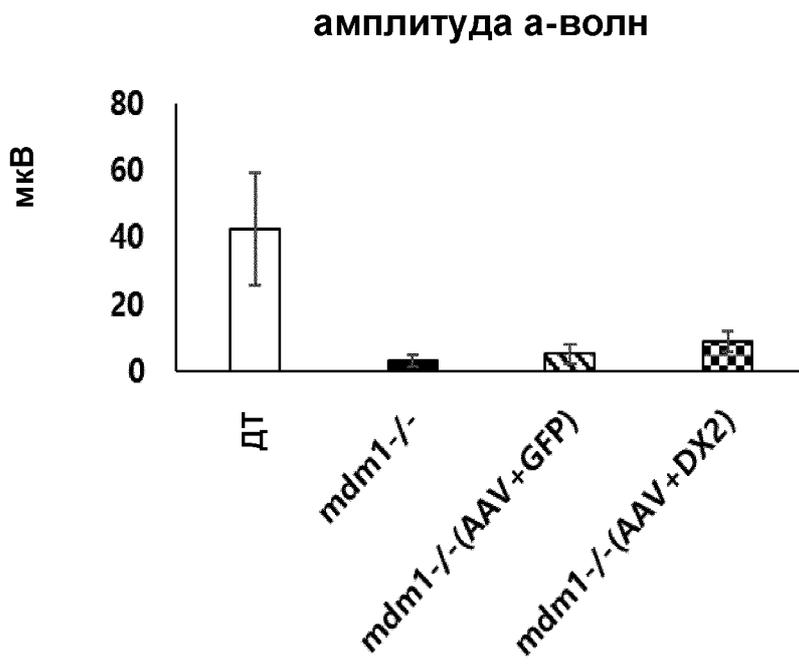
ФИГ. 15А



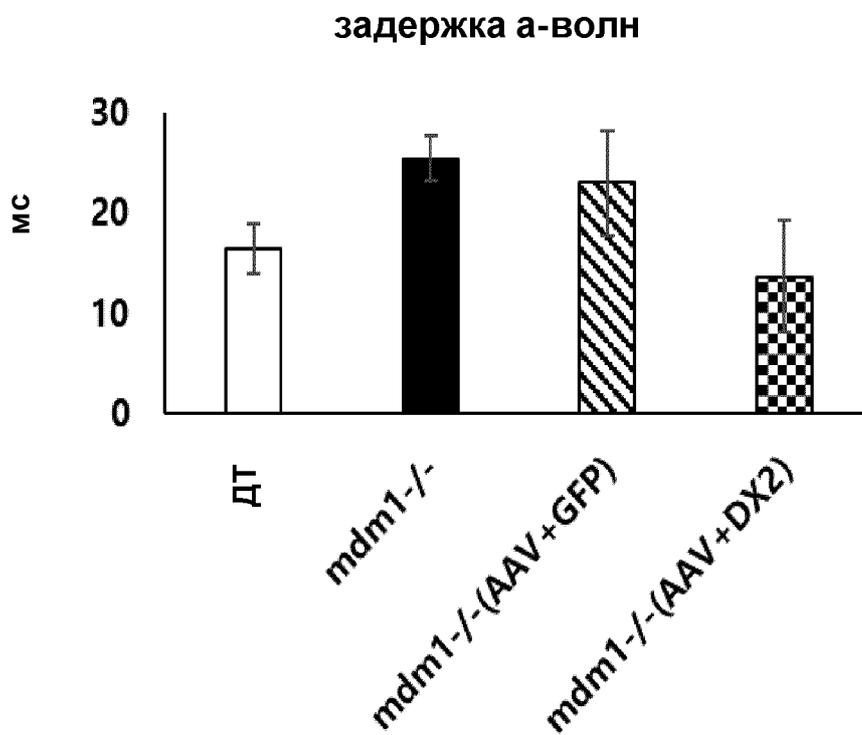
ФИГ. 15В



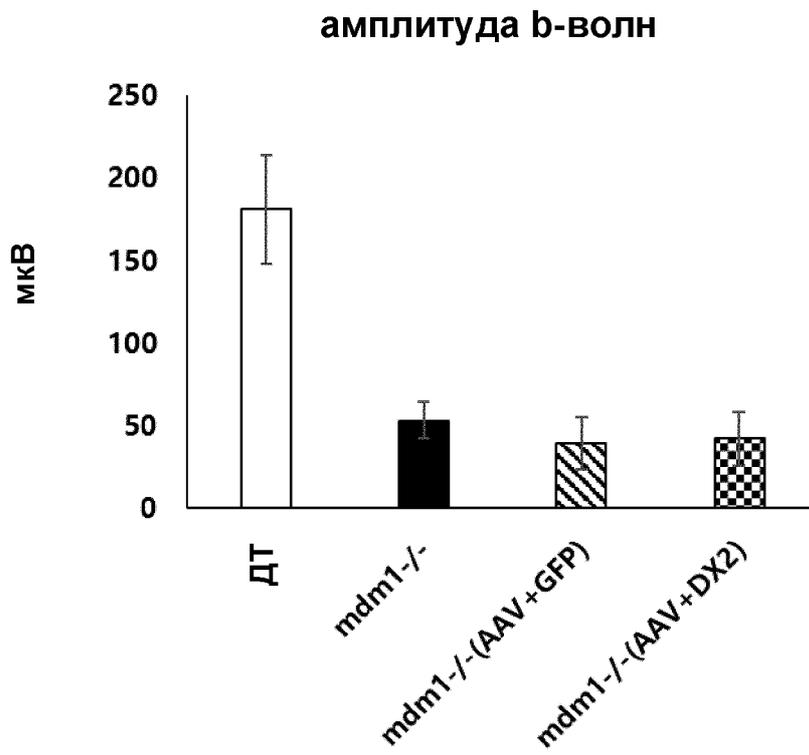
ФИГ. 15С



ФИГ. 15D



ФИГ. 15Е



ФИГ. 15F

