

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391004** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.08

(22) Дата подачи заявки
2021.10.07

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) **КОНСТРУКЦИИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ И ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ**

(31) **63/089,817**

(32) **2020.10.09**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/077666**

(87) **WO 2022/074105 2022.04.14**

(71) Заявитель:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:

**Дедьюрвоэрдер Стефани Мари,
Креймер Тэл, Сайпеки Ксилла,
Воллетт Бриттани Николь, Сюй
Мэйюй (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, к вирусным векторам и к вирусным частицам, содержащим трансген, кодирующий GAT-1; и к применению таких вирусных частиц для лечения заболеваний, опосредованных нарушением функции SLC6A1.

202391004
A1

202391004

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577438EA/042

КОНСТРУКЦИИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ И ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов и вирусных частиц для их применения в целях лечения и/или профилактики заболеваний, связанных с потерей функции члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), а именно, таких заболеваний как миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие признаки эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения.

Предпосылки создания изобретения

На сегодняшний день, тысячи генов связаны с нарушениями развития нервной системы, и с помощью клинического генетического тестирования, синдромы все чаще определяют по мутации генов, а не по их клиническим свойствам. Дизрупция гена SLC6A1 была идентифицирована как основная причина нарушений развития нервной системы широкого спектра, включая расстройство аутистического спектра (ASD), умственную отсталость (ID) и эпилептические припадки различных типов и степени тяжести. SLC6A1 кодирует GAT-1, член семейства переносчиков гамма-аминомасляной кислоты (GABA), экспрессируемых в центральной нервной системе (Bröer S. and Gether U. 2012. Br J Pharmacol 167: 256-278). Ген SLC6A1 был впервые клонирован в 1990 г. (Guastella J. et al. 1990. Science 249: 1303-1306) и принадлежит к семейству из 20 паралогов. Белки, кодируемые 13 из этих генов, продемонстрировали идентичность последовательностей выше 80%, а шесть из них способны переносить GABA с различной степенью специфичности к субстрату.

GAT-1 экспрессируется в широкой степени и исключительно в центральной нервной системе млекопитающих, а преимущественно в лобной коре головного мозга взрослого человека (Gamazon ER et al. 2018. Nat Genet 50: 956-967). В отличие от других переносчиков GABA, GAT-1 почти исключительно экспрессируется в окончаниях GABA-эргических аксонов и в астроцитах. В развивающемся головном мозге, GABA оказывает возбуждающее действие, но позже становится основным ингибирующим нейротрансмиттером в центральной нервной системе. Начало GABA-эргического ингибирования имеет важное значение для уравнивания возбуждения нейронов, а при значительном нарушении, оно негативно влияет на развитие мозга, что приводит к дефициту внимания и к нарушению когнитивных функций, а также к эпилептическим припадкам.

Белок GAT-1 состоит из 12 трансмембранных доменов, которые объединяются в одноцепочечный переносчик. Основная функция переносчиков GABA заключается в снижении концентрации GABA во внеклеточном пространстве (Scimemi A. 2014. Front

Cell Neurosci 8). Эта цель достигается за счет соединения перемещения GABA через клеточную мембрану с рассеиванием электрохимического градиента для натрия и хлорида (фигура 1). При перемещении этих ионов через мембрану в фиксированном соотношении к GABA (1 GABA: 2 Na⁺: 1 Cl⁻), GAT-1 генерирует стехиометрический ток (Lester HA et al. 1994. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 34: 219-249). В состоянии покоя, в пресинаптических окончаниях GABA-эргических нейронов, движущая сила для натрия и хлорида заставляет эти ионы двигаться из внеклеточного пространства к цитоплазме клетки, и таким образом переносить GABA в том же направлении. Транслокация GABA через мембрану происходит относительно быстро, что позволяет удалять GABA из внеклеточного пространства в течение нескольких миллисекунд после ее высвобождения (Isaacson et al. 1993. Neuron 10: 165-175). В дополнение к регулированию транспорта GABA, GAT-1 также действует как ионный канал и генерирует два ионных тока, которые стехиометрически не связаны с движением GABA через мембрану. Первый из них представляет собой входящий поток натрия, активируемый связыванием GABA с GAT-1 (Risso et al. 1996. J Physiol 490: 691-702). Второй ток представляет собой ток утечки, который может быть обнаружен даже в отсутствии GABA, и который опосредуется *in vitro* ионами щелочных металлов, таких как литий и цезий (MacAulay et al. 2002. J Physiol (Lond) 544: 447-458). И наконец, в отсутствии GABA, GAT-1 генерирует натрий-зависимые емкостные токи (Mager et al. 1993. Neuron 10: 177-188). Благодаря скоординированной активации этих токов, активация GAT-1 может генерировать локальный шунт (то есть, изменение сопротивления мембраны) или деполяризацию мембраны.

Существует пять основных вариантов сплайсинга человеческого SLC6A1, кодирующих три изоформы GAT-1, которые отличаются друг от друга альтернативным использованием экзонов с третьего по пятый. Транскрипт ENST00000287766 является самой длинной изоформой SLC6A1 и считается каноническим (Hunt et al. 2018. Database (Oxford) 2018 <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bay119/5255129>). Таким образом, большинство генетических вариантов картируются по их последовательности. Точная топология GAT-1 пока остается неясной из-за отсутствия кристаллической структуры. Моделирование гомологии GAT-1 (на основе кристаллической структуры LeuTAa, прокариотического гомолога переносчика лейцина из *Aquifex aeolicus* с гомологией последовательности GAT-1 на 20-25%) позволило идентифицировать остатки, которые необходимы для связывания субстрата и натрия в трансмембранных доменах 1, 3, 6, 8, и другие остатки, необходимые для осуществления конформационных переходов в процессе переноса (Bröer S. and Gether U. 2012. Br. J. Pharmacol. 167: 256-278).

Однако, как и в случае со многими другими генами, ассоциированными с нарушениями развития нервной системы, варианты SLC6A1 у пациентов широко распределены вдоль их последовательностей (Johannesen et al. 2018. Epilepsia 59: 389-402). У пациентов наблюдались варианты двух типов: (i) варианты усечения белка, которые

прекращают продуцирование белка для одного из двух наследуемых аллелей гена SLC6A1, и (ii) миссенс-варианты в критических областях белка, таких как сайты связывания с GABA и трансмембранные домены.

Таким образом, ожидаемым молекулярным патологическим механизмом развития заболеваний, ассоциированных с SLC6A1, является потеря функции или гаплонедостаточность. Модель заболевания подтверждается экспериментами как на мышцах дикого типа, так и на мышцах GAT-1^{-/-}, а также исследованиями рекомбинантных белков GAT-1 у индивидуумов с мутациями SLC6A1. Однако, механизмы, с помощью которых гаплонедостаточность приводит к клиническим проявлениям, пока еще полностью не изучены. Недавно полученные экспериментальные данные показали, что варианты SLC6A1, выявленные у пациентов с эпилепсией, снижают транспорт GABA *in vitro* (Mattison et al. 2018; Cai et al. 2019. *Epilepsia* 59: e135-e141). Другие данные свидетельствуют о том, что мутации SLC6A1 также могут вызывать нарушение транспорта белков (Cai et al. 2019. *Experimental Neurology* 320: 112973).

В настоящее время не существует конкретной модели генетического нарушения SLC6A1 у животных. Гетерозиготные (Het) мыши с нокаутом GAT-1 выглядят фенотипически нормальными, несмотря на то, что у них значительно снижена способность повторного поглощения GABA. Ранее были разработаны и частично охарактеризованы мыши с функциональным нокаутом GAT-1 (Chiu et al. 2005. *Neurosci* 25: 3234-3245; Cope et al. 2009. *Nature Medicine* 15: 1392-1398; Jensen et al. 2003. *Neurophysiology* 90: 2690-2701; Lester et al., 1994. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34: 219-249). У животных с полным нокаутом наблюдаются абсанс (малый эпилептический припадок), постоянный тремор, нарушение движения, снижение силы и подвижности, а также тревожное состояние (Chiu et al. 2005. *Neurosci* 25: 3234-3245; Cope et al. 2009. *Nature Medicine* 15: 1392-1398). Эти фенотипы соответствуют некоторым клиническим проявлениям расстройства, ассоциированного с SLC6A1, которые включают абсансы, нарушение подвижности и когнитивные нарушения (Johannesen et al. 2018. *Epilepsia* 59: 389-402).

Вальпроевая кислота сама по себе или в комбинации с другими противоэпилептическими препаратами, такими как вигабатрин, показала положительные результаты (Johannesen et al. 2018. *Epilepsia* 59: 389-402). Терапия с использованием небольших молекул или шапероновая терапия также считались теоретически вероятными вариантами повышения активности существующих белков GAT-1, но ни одна из них пока не увенчалась успехом. Ни одно из этих терапевтических вмешательств не затрагивает все или хотя бы небольшую часть патологических признаков, лежащих в основе очень разнообразных клинических проявлений, связанных с нарушением функции GAT-1. Следовательно, потребность в разработке улучшенных вариантов лечения расстройств, связанных с SLC6A1, все еще остается актуальной.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на решение вышеуказанных проблем путем

получения с помощью генотерапии безопасной копии гена SLC6A1 дикого типа, которая может подвергаться эндогенным регуляторным механизмам в трансдуцированной клетке и способна восстанавливать функцию переносчика GAT-1 до «нормального диапазона».

Настоящее изобретение может быть систематизировано в виде следующих вариантов:

Вариант 1: Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функцию GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile.

Вариант 2: Конструкция нуклеиновой кислоты в соответствии с Вариантом 1, где трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где указанный трансген предпочтительно содержит:

i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15 или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29.

Вариант 3: Конструкция нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов 1 или 2, дополнительно содержащая промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14.

Вариант 4: Конструкция нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где конструкция содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17.

Вариант 5: Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) в 5'- и/или 3'-конце указанной конструкции нуклеиновой кислоты, предпочтительно в 5'ITR и 3'ITR.

Вариант 6: Вирусный вектор в соответствии с вариантом 5, где 5'ITR и/или 3'ITR содержат ITR природного аденоассоциированного вируса (AAV), такого как AAV2.

Вариант 7: Вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 5 или 6, где 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Вариант 8: Вирусная частица, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов 1-4 или вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 5-7.

Вариант 9: Вирусная частица в соответствии с Вариантом 8, где вирусная частица содержит по меньшей мере капсидный белок VP1 от AAV, где указанный капсидный белок предпочтительно содержит AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (например, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (AAVtt, такой как AAV, содержащий SEQ ID NO: 24) или их комбинации.

Вариант 10: Вирусная частица в соответствии с Вариантом 9, где капсидный белок происходит от AAVtt и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

Вариант 11: Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функцию GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, а предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

Вариант 12. Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, который представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где указанный трансген предпочтительно содержит:

i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, более предпочтительно SEQ ID NO: 15;

ii. или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17, и где указанный вирусный

вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

Вариант 13. Вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 11 или 12, где указанный трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

Вариант 14. Вирусный вектор согласно любому из вариантов 11-13, где последовательность сигнала полиаденилирования содержит SEQ ID NO: 17.

Вариант 15: Вирусная частица, содержащая вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 11-14.

Вариант 16: Вирусная частица в соответствии с Вариантом 15, где вирусная частица содержит по меньшей мере капсидный белок VP1 от AAV, где указанный капсидный белок предпочтительно содержит AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (например, AAV, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (AAVtt), или их комбинации.

Вариант 17: Вирусная частица в соответствии с Вариантом 16, где капсидный белок происходит от AAV9 и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или AAVtt и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

Вариант 18: Плазмида, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов 1-4 или вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 5-7 или 11-14.

Вариант 19: Клетка-хозяин для получения вирусной частицы в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 15-17.

Вариант 20: Клетка-хозяин в соответствии с Вариантом 18, где клетка-хозяин содержит:

конструкцию нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов 1-4 или вирусный вектор в соответствии с любым из вариантов 5-7 или 11-14;

конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно плазмиду, кодирующую гены AAV гер и/или сар, которые не несут последовательности ITR; и, необязательно

конструкцию нуклеиновой кислоты, например, плазмиду или вирус, содержащие вирусные хелперные гены.

Вариант 21: Способ получения вирусной частицы в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 15-17, где указанный способ включает стадию:

культивирования клетки-хозяина в соответствии с любым из вариантов 19 или 20 в культуральной среде; и

сбора вирусных частиц из среды для культивирования клеток-хозяев и/или внутри клеток-хозяев.

Вариант 22: Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов 1-4, или вирусный вектор согласно

любому из вариантов 5-7 или 11-14, или вирусную частицу согласно любому из вариантов 8-10 или 15-17, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

Вариант 23: Вирусные частицы в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 15-17 для применения в терапии.

Вариант 24: Вирусные частицы для применения в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 15-17 для лечения и/или профилактики заболевания, характеризующегося гаплонедостаточностью SLC6A1, где указанное заболевание предпочтительно включает моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими нарушениями, раннее начало развития и эпилептическую энцефалопатию, эпилептическую энцефалопатию, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническую атоническую эпилепсию (MAE), MAE-подобные и другие признаки эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрению, или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA или их комбинации.

Вариант 25: Вирусная частица для применения в соответствии с любым из вариантов 23 или 24, где указанное применение предназначено для восстановления функции GAT-1 и/или снижения частоты эпилептических припадков.

Вариант 26: Вирусная частица для применения в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 15-17, где указанное заболевание связано по меньшей мере с одной мутацией у пациента, которая приводит к возникновению патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций.

Вариант 27: Вирусная частица для применения в соответствии с вариантом 26, где указанная мутация включает, по сравнению с SEQ ID NO: 18, R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинация.

Вариант 28: Способ лечения и/или профилактики заболевания, характеризующегося гаплонедостаточностью SLC6A1, где указанное заболевание предпочтительно включает моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими нарушениями, раннее начало развития и эпилептическую энцефалопатию, эпилептическую энцефалопатию, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническую атоническую эпилепсию (MAE), MAE-подобные и другие признаки эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрению, или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, вирусных частиц в соответствии с любым из вариантов 8-10 или 14-16.

Вариант 29: Способ согласно варианту 28, где указанный способ предназначен для восстановления функции GAT-1 и/или снижения частоты эпилептических припадков.

Вариант 30: Способ согласно любому из вариантов 28 или 29, где указанное заболевание связано по меньшей мере с одной мутацией у пациента, которая приводит к образованию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций.

Вариант 31: Способ согласно варианту 30, где указанная мутация включает, по сравнению с SEQ ID NO: 18, R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинации.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Рисунок, иллюстрирующий переносчик GAT-1, кодируемый SLC6A1, и его функцию. GAT-1 представляет собой растворенный белок-носитель, который регулирует поглощение внеклеточной GABA. Стехиометрия GAT-1: одна молекула ингибирующего нейротрансмиттера GABA переносится вместе с двумя катионами натрия и одним анионом хлорида по электрохимическому градиенту.

Фигура 2. Выравнивание белковых последовательностей GAT-1 человека, обезьяны и мыши (человеческий вариант согласно SEQ ID NO: 18). Выравнивание указывает на высокую идентичность последовательностей для трех видов.

Фигура 3. Схематический чертеж спроектированных конструкций. На этом чертеже, «prom»=промотор в целом, а различные проанализированные промоторы показаны внизу (CAG, EF1a, PGK и UсB); «INT» означает интрон, а «EX» означает экзон, «h» или «m»=человек и мышь, соответственно; SV40 означает последовательность полиаденилирования SV40; «метка»=метка HA или мус, расположенная либо на N-, либо на C-конце конструкции с промотором CAG.

Фигура 4. Клетки AD-HEK293, трансфицированные плазмидами hSLC6A1 и mSLC6A1 под контролем различных широко распространенных промоторов. В увеличенном срезе показано, что GAT-1 транспортировался в ожидаемый клеточный участок.

Фигура 5. А: Клетки Neuro-2A, трансфицированные плазмидами mSLC6A1, под контролем различных нейрон-специфических промоторов. В: Увеличение, показывающее, что GAT-1 транспортировался в ожидаемый клеточный участок.

Фигура 6. Вестерн-блот анализ (А) меченных HA и (В) Мус mSLC6A1 и hSLC6A1 в клетках AD-HEK293. Показаны две технические повторности для каждого условия. (С) Белки, меченные эпитопом, также были обнаружены с использованием антител против SLC6A1. С=контроль, 1=CAG-HA-hSLC6A1, 2=CAG-hSLC6A1-Мус, 3=CAG-Мус-hSLC6A1, 4=CAG-Мус-mSLC6A1, 5=CAG-mSLC6A1-Мус, Н=лизат головного мозга человека, М=лизат головного мозга мыши.

Фигура 7. (А) Схематический чертеж разработанных конструкций. На чертеже:

«h»=человек, WT=дикий тип, p=белок, IRES=внутренний сайт связывания с рибосомой, tagRFP=меченный белок, флуоресцирующий в красном диапазоне спектра, SV40=последовательность полиаденилирования обезьяньего вируса 40; (B) Анализ на поглощение GABA, обработанной тритием [³H] в трансфицированных клетках COS-7. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение и нормализованы по конструкции CAG-hSLC6A1-WT-IRES-tagRFP.

Фигура 8. Анализ на поглощение GABA, обработанной тритием [³H] в трансфицированных клетках SHSY-5Y. Клетки трансфицировали плазмидой, содержащей ITR AAV (pAAV), где экспрессия hSLC6A1 находится под контролем различных промоторов. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение и нормализованы по конструкции CAG-hSLC6A1-WT-IRES-tagRFP.

Фигура 9. Трансдукция лентивируса в нейронах NGN2, полученных из iPSC. Для каждого состояния показано одно репрезентативное изображение только с каналом, используемым для визуализации GAT-1.

Фигура 10. (A) Абсолютная количественная оценка с помощью количественной ПЦР копий вирусного генома с использованием SV40pA (сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40), нормализованного по абсолютному количеству диплоидного генома мыши. Результаты представлены в виде медианы ± межквартильный диапазон. (B) Анализ на экспрессию РНК. Данные показаны как относительная экспрессия, которая была масштабирована до средней экспрессии для всех групп. Результаты представлены как среднее геометрическое ± геометрическое стандартное отклонение.

Фигура 11. Анализ белков с помощью Вестерн-блот-анализа образцов, взятых из правой лобной коры. Панели A, C и E: Вестерн-блоттинг, представляющий экспрессию GAT-1 в различных протестированных конструкциях (n=5). Мыши из «контрольной группы AAV9» и контрольной группы «носитель-PBS» являются одинаковыми на всех трех панелях. Панели B, D и F представляют данные количественного определения с помощью соответствующих Вестерн-блот-анализов, где GAPDH использовали в качестве контроля загрузки и для нормализации интенсивности каждой полосы GAT-1. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение. В качестве масштабирующей группы использовали «контрольную группу AAV9». Панель G: Вестерн-блоттинг, представляющий экспрессию HA и GAPDH (контроля загрузки) трех вместе взятых конструкций. Панель H: Вестерн-блоттинг, представленный на панели G, был воспроизведен дважды, и данные были количественно оценены, усреднены для каждого образца и показаны на этой фигуре. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение.

Фигура 12. Тройное иммунологическое мечение для GFAP (астроциты), NeuN (нейроны) и HA (человеческий GAT-1) в сагиттальных срезах головного мозга мыши. AF=Alexa Fluor.

Фигура 13. Тройное иммунологическое мечение для GFAP (астроциты), NeuN (нейроны) и HA (человеческий GAT-1) в сагиттальных срезах гиппокампа мыши.

AF=Alexa Fluor.

Фигура 14. Тройное иммунологическое мечение для GFAP (астроциты), NeuN (нейроны) и HA (человеческий GAT-1) в сагитальных срезах коры головного мозга мыши. AF=Alexa Fluor.

Фигура 15. Среднее количество SWD у мышей SLC6A1^{+S295L}, которым вводили носитель-PBS (n=11), AAV9-PGK-HA-hSCL6A1 (n=8), AAV9-ENDO-HA-hSCL6A1 (n=13) и AAV9-hDLX-HA-hSCL6A1 (n=9). SWD анализировали через 6 недель после инъекции в течение 5 часов между 13:00 и 18:00 в течение 7 дней подряд. Различия между группами анализировали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа (с помощью критерия Крускала-Уоллиса) с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Данна (**p<0,01; ***p<0,001; ns, не значимые).

Фигура 16. (А) Абсолютная количественная оценка с помощью количественной ПЦР копий вирусного генома с использованием SV40pA (сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40), нормализованного по абсолютному количеству диплоидного генома мыши (ValidPRime®). Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение. Различия между группами (n=10-15) анализировали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа (критерия Крускала-Уоллиса) с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Данна. Значимой разницы между группами не наблюдалось. (В) Анализ на экспрессию РНК человеческого SLC6A1. Данные показаны как относительная экспрессия, которая была масштабирована до средней экспрессии для всех групп. Результаты показаны как среднее геометрическое ± геометрическое стандартное отклонение. Различия между группами (n=10-15) анализировали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса) с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Данна (**p<0,01; ***p<0,001; ns, не значимые).

Фигура 17. Анализ белка методом Вестерн-блоттинга образцов, взятых из половины медиальной лобной коры. Панели А, В и С: Вестерн-блоты, представляющие экспрессию белка GAT-1 (SLC6A1) из различных изученных вирусных векторов, контрольной группы PBS и группы дикого типа (n=7-10). Мыши из группы WT (дикого типа) и группы HET (мыши SLC6A1^{+S295L}) были одинаковыми на всех трех панелях. Панели D, E и F представляют собой данные количественного определения с помощью соответствующих Вестерн-блот-анализов, а GAPDH использовали в качестве контроля загрузки и для нормализации интенсивности каждой полосы GAT-1. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение. Группу WT использовали в качестве масштабирующей группы. Панели G и H: Вестерн-блоты, представляющие экспрессию HA и GAPDH (контроль загрузки) 3 вместе взятых вирусных векторов. Панель I: комбинированная количественная оценка с помощью Вестерн-блот-анализов, представленных на панелях G и H. GAPDH использовали в качестве контроля загрузки и для нормализации интенсивности каждой полосы GAT-1. Результаты показаны как среднее ± стандартное отклонение. Группу PGK использовали в качестве

масштабирующей группы для сравнения промоторов. Данные были проанализированы с использованием однофакторного ANOVA с последующим анализом с использованием критерия множественных сравнений Тьюки (* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

Подробное описание изобретения

Далее, настоящее изобретение будет описано на конкретных неограничивающих аспектах и вариантах его осуществления, а также со ссылкой на некоторые чертежи и примеры.

Технические термины используются здесь в их общепринятом смысле, если это не оговорено особо. Если конкретное значение определено каким-либо термином, то этот термин дан в контексте, в котором он используется.

Если неопределенный или определенный артикли, например, «a», «an» или «the», употребляются с существительным в единственном числе, то они могут также относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует иное.

Используемый здесь термин «содержащий» не исключает и другие элементы. В соответствии с целями настоящего изобретения, термин «состоящий из» рассматривается как предпочтительный вариант термина «состоящий из».

Используемые здесь термины «лечение», «терапия» и т.п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения развития заболевания или его симптома, и/или он может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или устранения неблагоприятного эффекта, связанного с этим заболеванием. Таким образом, лечение охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, а в частности, у человека, и включает: (a) предотвращение возникновения заболевания у индивидуума, то есть, у человека, который может быть предрасположен к развитию этого заболевания, но у которого оно еще не было диагностировано; (b) ингибирование заболевания, то есть, прекращение его развития; и (c) ослабление заболевания, то есть, стимуляцию регрессии заболевания.

Настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19, 20 и сохраняет функциональность GAT-1.

Используемый здесь термин «трансген» относится к молекуле нуклеиновой кислоты (или к нуклеиновой кислоте, обозначаемой сокращенно и используемой в настоящем описании как синоним), к ДНК или кДНК, кодирующей генный продукт для его применения в качестве активного компонента в генотерапии. Продукт гена может представлять собой один или более пептидов или белков.

В одном варианте осуществления изобретения, трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1).

Ген SLC6A1 расположен в коротком плече хромосомы 3 (геномные координаты GRCh38: 3:10,992,733-11,039,248 10,992,748-11,039,247) между геном SLC6A11 (кодирующим другой тип переносчика GABA) и геном HRH1 (кодирующим рецептор гистамина H1). Ген SLC6A1 имеет длину приблизительно 46,5 тысяч пар оснований (т.п.о.) и включает 18 экзонов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6529>). Существует пять основных вариантов, дающих три изоформы сплайсинга (a, b и c) GAT-1 человека, которые отличаются друг от друга альтернативным использованием экзонов с третьего по пятый. Транскрипт ENST00000287766, соответствующий кодирующей части последовательности CDS, представляет собой самую длинную изоформу SLC6A1 человека, считается канонической (Hunt et al. 2018) (фигура 2) и содержит SEQ ID NO: 15. Таким образом, большинство генетических вариантов картировано в этой последовательности. Известные генетические варианты включают вариант 2, содержащий SEQ ID NO: 26; вариант 3, содержащий SEQ ID NO: 27; вариант 4, содержащий SEQ ID NO: 28; и вариант 5, содержащий SEQ ID NO: 29.

В частности, конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит трансген, кодирующий GAT-1, а предпочтительно, кодирующий GAT-1 человека, где трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15.

Используемый здесь термин «GAT-1» относится к белку-переносчику гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1) (также называемому GABA-переносчиком 1; MAE; GAT1; GABATR; GABATHG (код Uniprot: P30531). Белок GAT-1 состоит из 12 трансмембранных доменов, которые объединяются в одноцепочечный переносчик. Пять вариантов сплайсинга SLC6A1 человека дают три изоформы сплайсинга GAT-1, то есть, изоформу a, содержащую SEQ ID NO: 18 (которая считается канонической последовательностью), кодируемую вариантами сплайсинга 1 или 2, содержащими SEQ ID NO: 15 и 26, соответственно; изоформу b, содержащую SEQ ID NO: 19, кодируемую вариантом сплайсинга 3, содержащим SEQ ID NO: 27; и изоформу c, содержащую SEQ ID NO: NO: 20, кодируемую вариантами сплайсинга 4 или 5, содержащими SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно. Используемый здесь термин GAT-1 относится ко всем вариантам и изоформам GAT-1, описанным в настоящей заявке (если это не оговорено особо).

Следовательно, в одном варианте осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий:

- i. SEQ ID NO: 18, 19, 20; или
- ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, или 19, или 20, и сохраняет функциональность GAT-1; или
- iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys;

Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15; или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» или «нуклеотидная последовательность» могут использоваться здесь как синонимы для обозначения любой молекулы, состоящей из мономерных нуклеотидов или содержащей мономерные нуклеотиды. Нуклеиновая кислота может быть олигонуклеотидом или полинуклеотидом. Нуклеотидная последовательность может представлять собой ДНК или РНК. Нуклеотидная последовательность может быть химически модифицированной или искусственной. Нуклеотидные последовательности включают пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), морфолино-нуклеиновые кислоты и блокированные нуклеиновые кислоты (LNA), а также гликоль-содержащие нуклеиновые кислоты (GNA) и треозо-нуклеиновые кислоты (TNA). Каждая из этих последовательностей отличается от природной ДНК или РНК изменениями в остове молекулы. Также могут быть использованы фосфоротиоатные нуклеотиды. Другие аналоги дезокси-нуклеотидов включают метилфосфонаты, фосфорамидаты, фосфордитиоаты, N3'P5'-фосфорамидаты и олигорибонуклеотидные фосфортиоаты и их 2'-O-аллильные аналоги и 2'-O-метилрибонуклеотидные метилфосфонаты, которые могут быть использованы в нуклеотиде согласно изобретению.

Кроме того, термин «конструкция нуклеиновой кислоты» относится к неприродной нуклеиновой кислоте, полученной в результате использования технологии рекомбинантных ДНК. В частности, конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая была модифицирована так, чтобы она содержала сегменты последовательностей нуклеиновых кислот, которые были объединены или совмещены по механизму, который ранее не существовал в природе.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит всю кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты или ее фрагмент (длиной по меньшей мере 1000, 1100, 1500, 2000, 2500 или по

меньшей мере 1500 нуклеотидов), которые по меньшей мере на 70%, 80%, 90%; 95%, 99% или 100% идентичны кодирующей последовательности природного или рекомбинантного функционального варианта GAT-1. Встречающиеся в природе варианты GAT-1 включают известный GAT-1 человека, приматов, мышей или других млекопитающих, а обычно GAT-1 человека, содержащий SEQ ID NO: 18, 19 или 20.

Используемый здесь термин «фрагмент» относится к непрерывной части эталонной последовательности. Так, например, фрагмент SEQ ID NO: 18, или 19, или 20 длиной по меньшей мере в 1000 нуклеотидов составляет 50, или 100, или 200, или 500, или 1000 и т.п. смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 18, или 19, или 20.

Используемый здесь термин «функциональный вариант» или «природный вариант» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или к аминокислотной последовательности, которые были модифицированы по сравнению с эталонной последовательностью, но которые сохраняют функцию указанной эталонной последовательности. Так, например, функциональный вариант SLC6A1 сохраняет способность кодировать GAT-1. Аналогичным образом, функциональный вариант GAT-1 сохраняет активность эталонного GAT-1. Встречающиеся в природе варианты GAT-1, в отличие от SEQ ID NO: 18, показаны в Таблице 3 и включают, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий GAT-1 человека, где указанный GAT-1 человека содержит SEQ ID NO: 18, или 19, или 20, например, трансген, содержащий SEQ ID NO: 15, или вариант указанного трансгена, состоящего из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 15. В одном варианте осуществления изобретения, вариант указанного трансгена содержит i) нуклеотидную последовательность, кодирующую часть GAT-1, содержащую SEQ ID NO: 18, или 19, или 20, или ii) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80% или по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 15 и сохраняет по существу такую же активность GAT-1, как и GAT-1 человека; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile.

Используемый здесь термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» относится к количеству совпадений (идентичных остатков нуклеиновой кислоты или аминокислот) в положениях при выравнивании двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения последовательностей, выровненных таким образом, чтобы максимизировать перекрытие и идентичность при минимальных пробелах в этих последовательностях. В частности, идентичность последовательностей может быть определена с использованием любого из ряда математических алгоритмов глобального или локального выравнивания в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности одинаковой длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритмов глобального выравнивания (например, алгоритма Нидлмана и Вюнша; Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol.; 48(3):443-53), которые позволяют оптимально выравнивать последовательности по всей длине, в то время как последовательности существенно различной длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма локального выравнивания (например, алгоритма Смита и Уотермана (Smith and Waterman, 1981, J Theor Biol.; 91(2):379-80) или алгоритма Альтшуля (Altschul SF et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25(17):3389-402., Altschul SF et al., 2005, Bioinformatics, 21(8):1451-6). Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, доступного на web-сайтах в Интернете, таких как <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> или [http:// www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для оценки такого выравнивания, включая любые

алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В соответствии с настоящим изобретением, значения % идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей относятся к значениям, полученным с использованием программы парного выравнивания последовательностей EMBOSS Needle, которая позволяет осуществлять оптимальное глобальное выравнивание двух последовательностей с использованием алгоритма Нидлмана-Вюнша, где все параметры поиска установлены по умолчанию, то есть, Матрица подсчета очков=BLOSUM62, число пробелов=10, число пробелов с удлинением=0,5, штраф за конечные пробелы=ложные значения, число пробелов в конце=10 и число пробелов с удлинением в конце=0,5.

Конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит трансген и по меньшей мере подходящий элемент нуклеиновой кислоты для его экспрессии, например, в хозяине, например, в клетке-хозяине.

Так, например, указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий GAT-1, и одну или более регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии GAT-1 у соответствующего хозяина. Обычно, конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген (например, кодирующий GAT-1) и регуляторные последовательности, предшествующие трансгену (5'-некодирующие последовательности) и следующие за трансгеном (3'-некодирующие последовательности), которые необходимы для экспрессии GAT-1.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения, указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере (i) трансген, кодирующий GAT-1, и ii) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном. Предпочтительно, чтобы трансген находился под контролем промотора.

Используемый здесь термин «промотор» относится к регуляторному элементу, который направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, с которой он функционально связан. Промотор может регулировать как скорость, так и эффективность транскрипции функционально связанной нуклеиновой кислоты. Промотор также может быть функционально связан с другими регуляторными элементами, которые усиливают («энхансеры») или подавляют («репрессоры») зависящую от промотора транскрипцию нуклеиновой кислоты. Эти регуляторные элементы включают, но не ограничиваются ими, сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания белков-репрессоров и активаторов и любые другие известные специалистам последовательности нуклеотидов, которые действуют прямо или косвенно для регуляции уровня транскрипции с промотора, включая, например, аттенуаторы, энхансеры и сайленсеры. Промотор расположен рядом с сайтом инициации транскрипции гена или кодирующей последовательности, с которой он функционально связан, на той же цепи и выше последовательности ДНК (по направлению к 5'-области смысловой цепи). Промотор может иметь длину приблизительно 100-1000 пар оснований. Положения в промоторе обозначены относительно сайта инициации транскрипции для конкретного гена (то есть,

вышерасположенные положения представляют собой отрицательные числа, считая в обратном порядке от -1, например -100 представляет собой положение, которое находится на 100 пар оснований выше по ходу транскрипции).

Используемый здесь термин «функционально связанный в ориентации 5'-3'» или просто «функционально связанный» относится к соединению двух или более нуклеотидных последовательностей в функциональном соотношении, которое позволяет каждой из указанных двух или более последовательностей выполнять свои обычные функции. Обычно, термин «функционально связанный» используется для обозначения юкта-положения регуляторного элемента, такого как промотор, и трансгена, кодирующего представляющий интерес белок. Так, например, функциональная связь между промотором и трансгеном позволяет промотору функционировать и запускать 5'-экспрессию трансгена в подходящей системе экспрессии, такой как клетка.

Обычно, такой промотор может быть промотором, специфичным для ткани или клеток конкретного типа, или промотором, специфичным для органа, или промотором, специфичным для множества органов, или системным или повсеместно встречающимся промотором.

Более конкретно, используемый здесь термин «повсеместно встречающийся промотор» относится к промотору, который является активным во множестве отдельных клеток или тканей, например, как в нейронах, так и в астроцитах.

Примеры промотора, подходящего для экспрессии трансгена в центральной нервной системе, включают промотор куриного бета-актина (CBA) (Miyazaki 1989, Gene 79:269-277), промотор CAG (Niwa 1991, Gene 108:193-199), промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1 α) (Nakai 1998, Blood 91:4600-4607), промотор гена синапсина 1 человека (hSyn) (Kugler S. et al. Gene Ther. 2003. 10(4):337-47) или промотор фосфолицераткиназы 1 (PGK1) (Hannan 1993, Gene 130:233-239), промотор метил-CPG-связывающего белка 2 (MECP2) (Adachi et al., Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722), промотор нейрон-специфической энolahзы (NSE) человека (Twyman, RM and EA Jones (1997). J. Mol. Neurosci. 8(1): 63-73)), промотор кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CAMKII) (Nathanson, JL, et al. (2009). Neuroscience 161(2): 441-450) и промотор человеческого убихитина C (UBC) (Schorpp, M., et al. (1996). Nucleic Acids Res. 24(9): 1787-1788).

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в 5'-3'-ориентации с SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 3.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35,

функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 7 или, предпочтительно, SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 11 или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанный промотор содержит SEQ ID NO: 14.

В альтернативных вариантах осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере (i) транскрипционный элемент, кодирующий GAT-1, и промотор, функционально связанный с указанным транскрипционным элементом, где промотор составляет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% от:

SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 1, функционально связанной в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3 или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанной в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7 или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанной в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или, предпочтительно, SEQ ID NO: 11, функционально связанной в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанной в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14.

Промотор, используемый в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, может представлять собой функциональный вариант или фрагмент промоторов, описанных в настоящей заявке. Функциональный вариант или фрагмент

промоторов, описанных в настоящей заявке, может быть функциональным в том смысле, что он сохраняет свойства соответствующего невариантного или полноразмерного промотора. Таким образом, функциональный вариант или фрагмент промоторов, описанных в настоящей заявке, сохраняет способность регулировать транскрипцию трансгена, с которым функционально связан указанный функциональный вариант или фрагмент, и тем самым регулировать экспрессию GAT-1, кодируемого указанным трансгеном. Функциональный вариант или фрагмент промоторов, описанных в настоящей заявке, может сохранять специфичность для конкретного типа ткани. Так, например, функциональный вариант или фрагмент промотора, описанный в настоящей заявке, может быть специфичным для клеток ЦНС, такой как эндогенный промотор hSLC6A1. Функциональный вариант или фрагмент промоторов, описанных в настоящей заявке, может специфически регулировать экспрессию GAT-1 в нейронах и/или в астроцитах.

Промоторы, используемые в настоящем изобретении, могут содержать «минимальную последовательность», под которой следует понимать нуклеотидную последовательность промотора достаточной длины, которая содержит элементы, необходимые для функционирования в качестве промотора, то есть, способные регулировать транскрипцию трансгена, с которым функционально связан указанный промотор, и тем самым регулировать экспрессию GAT-1.

Минимальный промотор, используемый в конструкциях нуклеиновых кислот согласно изобретению, может представлять собой, например, промотор CAG, содержащий SEQ ID NO: 1, или промотор EF1a, содержащий SEQ ID NO: 5, или промотор hDLX, содержащий SEQ ID NO: 11.

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

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

Интроны, которые могут быть включены в промоторы, используемые в настоящем изобретении, могут происходить из природных некодирующих областей или могут быть получены путем конструирования.

Интроны, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой: а)

химерный интрон CBA/RbG, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 2 или ее функционального варианта или фрагмента, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичны SEQ ID NO: 2; b) интрон EF1a, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 2 или ее функционального варианта или фрагмента, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичны SEQ ID NO: 6; или c) интрон MECP2, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 34 или ее функционального варианта или фрагмента, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичны SEQ ID NO: 34; или d) интрон hDLX, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 13 или ее функционального варианта или фрагмента, которые по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичны SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь промоторы и/или интроны могут быть объединены с неэкспрессирующими экзонными последовательностями. Неэкспрессирующие экзонные последовательности не способны продуцировать транскрипт, но могут фланкировать интронную последовательность, обеспечивая тем самым сайты сплайсинга.

Альтернативно, промотор для использования в настоящем изобретении может представлять собой химически индуцируемый промотор. Используемый здесь химически индуцируемый промотор представляет собой промотор, который регулируется введением *in vivo* химического индуктора указанному индивидууму, нуждающемуся в этом. Примерами подходящих химическим индуцируемых промоторов являются, но не ограничиваются ими, промотор, индуцируемый тетрациклином/миноциклином (Chiaro 2003, *Neurosci Lett.* 352:155-158), или системы, индуцируемые рапамицином (Sanftner 2006, *Mol Ther.* 13:167-174).

Конструкция нуклеиновой кислоты согласно изобретению может дополнительно содержать 3'-нетранслируемую область, которая обычно содержит последовательность сигнала полиаденилирования и/или терминатор транскрипции.

Используемый здесь термин «последовательность сигнала полиаденилирования» (или «сайт полиаденилирования» или «poly(A)-сигнал», которые используются здесь как синонимы) относится к специфической последовательности распознавания в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) гена, который транскрибируется в молекулу мРНК-предшественника и регулирует терминацию транскрипции гена. Последовательность сигнала полиаденилирования служит сигналом для эндонуклеолитического расщепления новообразованного мРНК-предшественника на своем 3'-конце и для присоединения к этому 3'-концу участка РНК, состоящего только из адениновых оснований (процесс полиаденилирования; poly(A)-хвост). Последовательность сигнала полиаденилирования играет важную роль в ядерном экспорте, в трансляции и в стабильности мРНК. В контексте настоящего изобретения, последовательность сигнала полиаденилирования представляет собой последовательность распознавания, которая может регулировать

полиаденилирование генов млекопитающих и/или вирусных генов в клетках млекопитающих.

Сигналы последовательности сигнала полиаденилирования обычно состоят из а) консенсусной последовательности AAUAAA, которая, как было показано, необходима как для расщепления у 3'-конца, так и для полиаденилирования матричной пре-РНК (пре-мРНК), а также для последующей стимуляции терминации транскрипции, и б) дополнительных элементов, расположенных выше и ниже от AAUAAA, которые регулируют эффективность действия AAUAAA в качестве poly(A)-сигнала. Существует значительная вариабельность этих мотивов в генах млекопитающих.

В одном варианте осуществления изобретения, необязательно в комбинации с одним или более признаками различных вариантов осуществления изобретения, описанных выше или ниже, последовательность сигнала полиаденилирования конструкции нуклеиновой кислоты согласно изобретению представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования гена млекопитающего или вирусного гена. Подходящие сигналы полиаденилирования включают, помимо прочего, ранний сигнал полиаденилирования SV40, поздний сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования тимидинкиназы HSV, сигнал полиаденилирования гена протамина, сигнал полиаденилирования аденовируса 5 E1b, сигнал полиаденилирования гормона роста, сигнал полиаденилирования PBGD, *in silico* сконструированный сигнал полиаденилирования (синтетический) и т.п.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 1 или, предпочтительно, SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или SEQ ID NO: 3; или SEQ ID NO: 4; или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или SEQ ID NO: 7; или SEQ ID NO: 8; или SEQ ID NO: 9; или SEQ ID NO: 10; или SEQ ID NO: 11, или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или SEQ ID NO: 14, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно, последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно, последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17. Предпочтительно, трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенного вещества

(SLC6A1), содержащий SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты содержит трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; и где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; где трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), содержащий SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1) и сохраняющий функциональность GAT-1, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1) и сохраняющий функциональность GAT-1, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17.

В другом варианте осуществления изобретения, трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1) и сохраняющий функциональность GAT-1, дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; и где трансген, кодирующий белок-

переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержит, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, а предпочтительно одну или более мутаций, выбранных из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; Val578Ile.

Конструкция нуклеиновой кислоты может также содержать дополнительные регуляторные элементы, такие как, например, энхансерные последовательности, интроны, последовательность, нацеленную на микроРНК, полилинкерную последовательность, облегчающую вставку фрагмента ДНК в вектор, и/или последовательности сигнала сплайсинга.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вирусному вектору, содержащему описанную здесь конструкцию нуклеиновой кислоты.

Термин «вирусный вектор» обычно относится к части нуклеиновой кислоты вирусной частицы, раскрытой в настоящей заявке, которая может быть упакована в капсид с образованием вирусной частицы для доставки хозяину, например, пациенту.

Вирусные векторы согласно изобретению обычно содержат по меньшей мере (i) конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген и подходящие элементы нуклеиновой кислоты для их экспрессии в организме хозяина, и (ii) весь вирусный геном или его часть, например, по меньшей мере, инвертированные концевые повторы вирусного генома.

Используемый здесь термин «инвертированный концевой повтор (ITR)» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной на 5'-конце (5'ITR), и к нуклеотидной последовательности, расположенной на 3'-конце (3'ITR) вируса, которые содержат палиндромные последовательности, и которые могут укладываться с образованием Т-образных шпильчатых структур, которые функционируют как праймеры во время инициации репликации ДНК. Они также необходимы для интеграции вирусного генома в геном хозяина; для спасения генома хозяина; и для капсидирования вирусной нуклеиновой кислоты в зрелые вирионы. ITR необходимы в цис-положении для репликации генома вектора и его упаковки в вирусные частицы.

В одном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор согласно изобретению содержит 5'ITR и 3'ITR вируса.

В одном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит 5'ITR и 3'ITR вируса, независимо выбранного из группы, состоящей из парвовирусов (в частности, аденоассоциированных вирусов), аденовирусов, альфавирусов, ретровирусов (в частности, гамма-ретровирусов и лентивирусов), герпесвирусов и SV40; а в предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирус представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус (Ad) или лентивирус. Более предпочтительным является AAV.

В одном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит 5'ITR и 3'ITR AAV.

AAV вызывает значительный интерес у специалистов как потенциальный вектор для генотерапии человека. К числу благоприятных свойств такого вируса относятся отсутствие его связи с какими-либо заболеваниями человека, его способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, а также широкий спектр клеточных линий, происходящих от различных тканей, которые могут быть инфицированы. Геном AAV состоит из линейной одноцепочечной молекулы ДНК, которая содержит 4681 основание (Berns and Bohezky, 1987, *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32:243-307). Геном включает инвертированные концевые повторы (ITR) на каждом конце, которые функционируют в цис-положении как ориджины репликации ДНК и как сигналы упаковки для вируса. Длина ITR составляет приблизительно 145 п.о.

ITR AAV в вирусных векторах согласно изобретению могут иметь нуклеотидную последовательность дикого типа или могут быть изменены путем инсерции, делеции или замены одного или более нуклеотидов, обычно не более 5, 4, 3, 2 или 1 инсерции, делеции или замены нуклеотидов, по сравнению с известными ITR AAV. Серотип инвертированных концевых повторов (ITR) вектора AAV может быть выбран из любого известного человеческого или нечеловеческого серотипа AAV.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор может быть получен с использованием ITR любого серотипа AAV. Известные ITR AAV включают, но не ограничиваются ими, AAV1, AAV2, AAV3 (включая типы 3A и 3B), AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 (AAVrh10), AAV11, AAV12, птичий AAV, бычий AAV, собачий AAV, лошадиный AAV, овечий AAV. Также включены рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, выделенные из головного мозга приматов.

Альтернативно, вирусный вектор согласно изобретению может содержать синтетические 5'ITR и/или 3'ITR.

В одном варианте осуществления изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты, описанная выше, содержится в указанном вирусном векторе, который дополнительно содержит 5'ITR и 3'ITR AAV серотипа AAV2. В конкретном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит 5'ITR и 3'ITR AAV серотипа AAV2, предпочтительно SEQ ID NO: 15 и/или 16, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15 и/или 16.

В одном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке, где вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

В одном варианте осуществления изобретения, 5'ITR и/или 3'ITR содержат ITR природного аденоассоциированного вируса (AAV), такого как AAV2.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий GAT-1 и содержащий:

i. SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1;

где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; и где вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий

указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

В одном варианте осуществления изобретения, 5'ITR и/или 3'ITR содержат ITR природного аденоассоциированного вируса (AAV), такого как AAV2.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусный вектор содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий GAT-1 и включающий:

a) SEQ ID NO: 18, 19, 20; или
 b) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или

c) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile.

где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; и где вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR; где 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23. Более предпочтительно, трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), содержащий SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а еще более предпочтительно SEQ ID NO: 15.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция

нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR. Более предпочтительно, трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR. Более предпочтительно, трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую

трансген, который представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где трансген предпочтительно содержит:

- i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, более предпочтительно SEQ ID NO: 15;
- ii. или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29.

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно 5'ITR и 3'ITR. Более предпочтительно, трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, который представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где трансген предпочтительно содержит:

- i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15;
- ii. или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или на 96%, или на 97%, или на 98%, или на 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29.

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, а предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, а предпочтительно 5'ITR и 3'ITR. Более предпочтительно, трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

Трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1) и сохраняет функциональность GAT-1, где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность сигнала

полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17; где трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержит, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, а предпочтительно одну или более мутаций, выбранных из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; Val578Ile.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вирусной частице, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты или вирусный вектор, описанные в настоящей заявке.

Используемый здесь термин «вирусная частица» относится к инфекционной и обычно дефектной по репликации вирусной частице, содержащей (i) вирусный вектор, упакованный внутри (необязательно содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген), и (ii) капсид.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, капсид образован капсидными белками аденоассоциированного вируса.

Белки вирусного капсида аденоассоциированного вируса включают капсидные белки VP1, VP2 и VP3. Различия между последовательностями белков капсида различных серотипов AAV позволяют использовать различные рецепторы клеточной поверхности для проникновения в клетку. В комбинации с альтернативными путями внутриклеточного процессинга это позволяет достичь тропизма различных тканей для каждого серотипа AAV.

Обычно, вирусы AAV обозначают по их серотипу. Серотип соответствует вариантному подвиду AAV, который благодаря своему профилю экспрессии поверхностных антигенов капсида обладает характерной реактивностью, которую можно использовать для отличия его от других вариантов подвида. Серотипы AAV включают AAV1, AAV2, AAV3 (включая A и B) AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 (AAVrh10) или AAV11 или их комбинации, а также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, выделенные из головного мозга приматов. В вирусной частице согласно изобретению, капсид может происходить от любого серотипа AAV и комбинаций серотипов (например, VP1 от AAV и VP2 и/или VP3 от другого серотипа).

В конкретных вариантах осуществления изобретения, примеры серотипов AAV капсидных белков для их применения в вирусной частице согласно изобретению

включают AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, AAV2-retro или AAVtt.

Следовательно, в одном варианте осуществления изобретения, вирусная частица согласно изобретению содержит по меньшей мере капсидный белок VP1 от AAV, где указанный капсидный белок предпочтительно содержит AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (такой как AAV9.hu14, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (AAVtt, содержащий SEQ ID NO: 24) или их комбинации.

AAVtt подробно описан в публикации Tordo et al., Brain. 2018; 141(7): 2014-2031 и в WO 2015/121501, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Обзоры серотипов и вариантов AAV можно найти у Choi et al. (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310) и Wu et al. (Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит капсидный белок от AAVtt и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит капсидный белок от AAV9 и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25.

Геномы AAV или элементы геномов AAV, включая последовательности ITR, гены гер или сар для использования в настоящем изобретении, могут быть доступны под следующими номерами доступа для последовательностей полного генома AAV: Аденоассоциированный вирус 1 NC_002077, AF063497; Аденоассоциированный вирус 2 NC_001401; Аденоассоциированный вирус 3 NC_001729; Аденоассоциированный вирус 3В NC_001863; Аденоассоциированный вирус 4 NC_001829; Аденоассоциированный вирус 5 Y18065,5AF085716; Аденоассоциированный вирус 6 NC_001862; птичий AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; птичий штамм AAV DA-1 NC_006263, AY629583; бычий AAV NC_005889, AY388617.

Вирусы AAV также могут называться по их кладотипам или клонам. Это относится к филогенетическому родству природных AAV-вирусов и, обычно, к филогенетической группе AAV-вирусов, которая восходит к общему предку и включает всех их потомков. Кроме того, вирусы AAV могут называться по их конкретному изоляту, то есть, генетическому изоляту определенного вируса AAV, встречающегося в природе.

Термин генетический изолят описывает популяцию вирусов AAV, которые подвергались ограниченному генетическому смешиванию с другими встречающимися в природе вирусами AAV, что позволяет определить узнаваемо отличающуюся популяцию на генетическом уровне. Примеры кладотипов и изолятов AAV, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают:

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

- Кладотип В: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AYS30624, Hu64 AY530625, Hul3 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 25 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, HuT70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377;

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

- Кладотип D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, C5 y2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013;

- Кладотип E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 10 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh1O AY243015, Hul7 AY530582, Hub AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pil AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rhbl AY530572, Rh52AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 15 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rhl AY530556; и

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

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

Настоящее изобретение охватывает использование последовательностей капсидных белков различных серотипов, кладотипов, клонов или изолятов AAV в одном и том же векторе. Настоящее изобретение также охватывает упаковку генома одного серотипа в капсид другого серотипа, то есть, псевдотипирование. Химерные, перетасованные или модифицированные капсидом производные могут быть выбраны для обеспечения одной или более желаемых функциональных свойств. Таким образом, эти производные могут демонстрировать повышенную эффективность доставки генов, пониженную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный диапазон тропизма и/или улучшенное нацеливание на клетки определенного типа по сравнению с вирусным вектором AAV, содержащим природный капсид AAV, такой как AAV2. На повышенную эффективность доставки генов может влиять улучшенное связывание

рецептора или корецептора на клеточной поверхности, улучшенная интернализация, улучшенный перенос внутри клетки и в ядро, улучшенное снятие оболочки с вирусной частицы и улучшенное превращение одноцепочечного генома в двухцепочечную форму. Повышенная эффективность может также быть связана с измененным диапазоном тропизма или нацеливанием на конкретную клеточную популяцию, так, чтобы доза вектора не разбавлялась при введении в ткани там, где это не требуется.

Химерные капсидные белки включают белки, генерируемые рекомбинацией между двумя или более кодирующими капсид последовательностями встречающихся в природе серотипов AAV. Это может быть достигнуто, например, с применением метода «спасения» маркеров, при котором неинфекционные последовательности капсида одного серотипа котрансфицируют последовательностями капсида 5 другого серотипа, и проводят направленный отбор для идентификации последовательностей капсида, обладающих желаемыми свойствами. Капсидные последовательности различных серотипов могут быть изменены посредством гомологичной рекомбинации внутри клетки с образованием новых химерных капсидных белков.

Химерные капсидные белки также включают белки, созданные с путем конструирования последовательностей капсидных белков для переноса специфических доменов капсидных белков, поверхностных петель или специфических аминокислотных остатков между двумя или более капсидными белками, например, между двумя или более капсидными белками различных серотипов. Перетасованные или химерные капсидные белки также могут быть получены путем перетасовки ДНК или с помощью ПЦР с вероятностью ошибки. Гибридные капсидные гены AAV могут быть созданы путем случайной фрагментации последовательностей родственных генов AAV, например, генов, которые кодируют капсидные белки нескольких различных серотипов, с последующей повторной сборкой фрагментов посредством полимеразной реакции аутопраймирования, которая также может вызывать образование кроссинговеров в областях гомологии последовательностей. Библиотека гибридных генов AAV, созданная таким образом путем перетасовки капсидных генов нескольких серотипов, может быть подвергнута скринингу для идентификации вирусных клонов, обладающих желаемой функциональностью. Аналогичным образом, ПЦР с вероятностью ошибки может быть проведена для введения случайной мутации генов капсида AAV в целях создания разнообразной библиотеки вариантов, которые затем могут быть отобраны по желаемому свойству.

Последовательности капсидных генов также могут быть генетически модифицированы для введения специфических делеций, замен или инсерций по сравнению с нативной последовательностью дикого типа. В частности, гены капсида могут быть модифицированы путем инсерции последовательности неродственного белка или пептида в открытую рамку считывания последовательности, кодирующей капсид, или на N- и/или C-конце последовательности, кодирующей капсид. Неродственный белок или пептид может преимущественно действовать как лиганд для клеток определенного типа, что тем самым будет обеспечивать улучшенное связывание с клеткой-мишенью или

улучшенную специфичность нацеливания вирусной частицы на конкретную клеточную популяцию. Неродственным белком может быть также белок, который способствует очистке вирусной частицы во время ее продуцирования, то есть, эпитоп или аффинная метка. Сайт инсерции обычно выбирают таким образом, чтобы он не оказывал негативного влияния на другие функции вирусной частицы, например, на интернализацию и перенос вирусной частицы. Специалист в данной области может определить подходящие сайты для введения на основании своих общих знаний. Конкретные сайты раскрыты в публикации Choi et al., упомянутой выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная частица согласно изобретению может быть получена путем инкапсуляции вирусного вектора/генома AAV, происходящего от определенного серотипа AAV, или сконструированного вирусного вектора, в вирусную частицу, образованную природными Сар-белками, соответствующими AAV такого же конкретного серотипа. Тем не менее, было разработано несколько методов модификации и улучшения структурных и функциональных свойств встречающихся в природе вирусных частиц (Bünning H et al. *J Gene Med* 2008; 10: 717-733). Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения, вирусные частицы согласно изобретению включают конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий GAT-1, фланкированный ITR данного серотипа AAV, упакованный, например: а) в вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, происходящих от одного и того же или другого серотипа AAV, например, ITR AAV2 и капсидных белков AAV9; ITR AAV2 и капсидных белков AAVtt; б) в мозаичную вирусную частицу, состоящую из смеси капсидных белков различных серотипов или мутантов AAV, например, ITR AAV2 с капсидом, образованным белками двух или более серотипов AAV; в) в химерную вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, которые были усечены путем замены доменов между различными серотипами или вариантами AAV, например, ITR AAV2 с капсидными белками AAV5 с доменами AAV3; или д) в вирусную частицу, сконструированную так, чтобы она могла отображать домены селективного связывания, обеспечивающие жесткое взаимодействие со специфическими рецепторами клетки-мишени.

Генотерапия на основе AAV, нацеленная на ЦНС, уже была рассмотрена в публикации Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ et al., *J Neural Transm* 2018;125:575-589. Более конкретно, частицы AAV могут быть отобраны и/или сконструированы таким образом, чтобы они могли нацеливаться по меньшей мере на нейроны и микроглиальные клетки головного мозга и ЦНС.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, примеры серотипа AAV капсидных белков для применения вирусной частицы AAV согласно изобретению включают AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (например, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (такой как AAVtt, содержащий SEQ ID NO: 24) или их комбинации. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения, указанный серотип AAV капсидных белков выбран из серотипа AAV9 или AAVtt.

Капсид AAVtt, также называемый капсидом природного типа AAV2, описан, например, в WO2015/121501. В одном варианте осуществления изобретения, капсидный белок AAVtt VP1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с капсидным белком AAV VP1 дикого типа в положении, соответствующем одному или более из следующих положений в последовательности белка AAV2 (эталонная последовательность NCBI: YP_680426.1): 125, 151, 162, 312, 457, 492, 499, 533, 546, 548, 585, 588 и/или 593, а более конкретно, AAVtt содержит одну или более из следующих аминокислотных замен по сравнению с капсидным белком AAV2 VP1 дикого типа (эталонная последовательность NCBI: YP_680426.1): V125I, V151A, A162S, T205S, N312S, Q457M, S492A, E499D, F533Y, G546D, E548G, R585S, R588T и/или A593S. В одном конкретном варианте осуществления изобретения, AAVtt содержит четыре или более мутаций по сравнению с капсидным белком VP1 AAV2 дикого типа в положениях 457, 492, 499 и 533.

В конкретном варианте осуществления изобретения, необязательно в комбинации с одним или более признаками различных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке, вирусная частица содержит описанный выше вирусный вектор, предпочтительно содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий i) SEQ ID NO: 18, 19, 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и содержащий капсидные белки серотипа AAV9 или серотипа AAVtt, предпочтительно капсидный белок серотипа AAVtt, содержащий SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

В другом варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит

вирусный вектор, включающий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий i) SEQ ID NO: 18, 19, 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; Val578Ile; и содержащий капсидные белки серотипа AAV9 или серотипа AAVtt, предпочтительно капсидный белок серотипа AAVtt, содержащий SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения, необязательно в комбинации с одним или более признаками различных вариантов осуществления изобретения, описанных выше или ниже, вирусная частица содержит описанный выше вирусный вектор, предпочтительно содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий: i) SEQ ID NO: 18, 19, 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe;

Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и содержащий капсидные белки серотипа AAV9 или серотипа AAVtt, предпочтительно капсидный белок серотипа AAV9, содержащий SEQ ID NO: 25 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25.

В другом варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит вирусный вектор, включающий конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий i) SEQ ID NO: 18, 19, 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; Val578Ile; и содержащий капсидные белки серотипа AAV9 или серотипа AAVtt, предпочтительно капсидный белок серотипа AAV9, содержащий SEQ ID NO: 25 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и

сохраняет функциональность GAT-1, или iii) природный вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, показанных в Таблице 3;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34;

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и последовательности 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, более предпочтительно последовательности 5'ITR и последовательности 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит последовательности или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, более предпочтительно последовательности 5'ITR и последовательности 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо

содержит последовательности или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, показанных в Таблице 3;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34;

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV9, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV9, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит последовательности или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно

последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV9, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29; или

В) трансген, кодирующий GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняющую функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His ;Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанная вирусная частица содержит капсидные белки AAVtt, предпочтительно включающие SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29; или

В) трансген, кодирующий GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанная вирусная частица содержит капсидные белки AAV9, предпочтительно включающие SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 25.

Получение рекомбинантных вирусных частиц AAV по существу известно специалистам в данной области и описано, например, в патентах США 5173414 и 5139941; в WO 92/01070, WO 93/03769, Lebkowski et al. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; и Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801.

Получение вирусных частиц, несущих конструкцию вирусного вектора и нуклеиновой кислоты, как описано выше, может быть осуществлено с помощью обычных

способов и протоколов, которые выбирают с учетом структурных особенностей, выбранных для практического получения варианта вирусных частиц.

Вкратце, вирусные частицы могут быть получены в клетке-хозяине, а более конкретно, в специфической клетке, продуцирующей вирус (в упаковывающей клетке), которая трансфицирована упаковываемой конструкцией нуклеиновой кислоты или вирусным вектором, в присутствии хелперного вектора или вируса или другой (других) конструкции(й) ДНК.

Используемый здесь термин «упаковывающие клетки» относится к клетке или клеточной линии, которые могут быть трансфицированы конструкцией нуклеиновой кислоты или вирусным вектором согласно изобретению, и обеспечивают *in trans* все недостающие функции, необходимые для полной репликации и упаковки вирусного вектора. Обычно, упаковывающие клетки экспрессируют по конститутивному или индуцибельному механизму одну или более из указанных отсутствующих вирусных функций. Указанные упаковывающие клетки могут быть прикрепленными или суспензионными клетками.

Обычно, способ получения вирусных частиц включает следующие стадии:

культивирования упаковывающей клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты или вирусный вектор, как описано выше, в культуральной среде; и

сбора вирусных частиц из супернатанта клеточной культуры и/или внутри клеток.

Для получения вирусных частиц могут быть применены обычные способы, которые заключаются во временной котрансфекции клеток конструкцией нуклеиновой кислоты или экспрессионным вектором (например, плазмидой), несущим трансген, кодирующий GAT-1; конструкцией нуклеиновой кислоты (например, хелперной плазмидой AAV), которая кодирует гены *тер* и *сар*, но не несет последовательности ITR; и третьей конструкцией нуклеиновой кислоты (например, плазмидой), обеспечивающей аденовирусные функции, необходимые для репликации AAV. Вирусные гены, необходимые для репликации AAV, называются здесь вирусными хелперными генами. Обычно, указанные гены, необходимые для репликации AAV, представляют собой аденовирусные хелперные гены, такие как E1A, E1B, E2a, E4 или РНК VA. Предпочтительно, аденовирусные хелперные гены относятся к серотипу Ad5 или Ad2.

Крупномасштабное продуцирование частиц AAV согласно изобретению также может быть осуществлено, например, путем инфицирования клеток насекомых комбинацией рекомбинантных бакуловирусов (Urabe et al. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 1935-1943). Клетки SF9 коинфицируют двумя или тремя бакуловирусными векторами, соответственно экспрессирующими AAV *тер*, AAV *сар* и вектором AAV, подлежащим упаковке. Рекомбинантные бакуловирусные векторы будут обеспечивать функции вирусного хелперного гена, необходимые для репликации и/или упаковки вируса. В публикации Smith et al. 2009 (*Molecular Therapy*, vol.17, no.11, pp 1888-1896) также описана двойная бакуловирусная система экспрессии для крупномасштабного продуцирования частиц AAV в клетках насекомых.

Подходящие культуральные среды известны специалистам в данной области. Ингредиенты, входящие в состав таких сред, могут варьироваться в зависимости от типа культивируемых клеток. Помимо состава питательных веществ, важными параметрами культуральных сред считаются осмотическая концентрация и pH. Среда для роста клеток содержит ряд ингредиентов, хорошо известных специалистам в данной области, включая аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли, источники углеводов, липиды, микроэлементы (среди прочих, CuSO_4 , FeSO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, ZnSO_4), где каждый ингредиент присутствует в количестве, которое поддерживает культивирование клеток *in vitro* (то есть, выживание и рост клеток). Ингредиенты могут также включать различные вспомогательные вещества, такие как буферные вещества (такие как бикарбонат натрия, *Hepes*, *Tris* или буферы с аналогичным действием), стабилизаторы окисления, стабилизаторы для противодействия механическому стрессу, ингибиторы протеазы, факторы роста животных, растительные гидролизаты, агенты, препятствующие агрегации, пеногасители. Свойства и составы сред для роста клеток могут варьироваться в зависимости от конкретных потребностей клеток. Примерами коммерчески доступных сред для культивирования клеток являются: MEM (минимальная поддерживающая среда), BME (базальная среда Игла), DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), DMEM Исков (модифицированная по способу Исков среда Дульбекко), GMEM, RPMI 1640, среда Лейбовица L-15, среда Маккоя, среда 199, среда Хэмса F10 и производные, такие, как среда Хэмса F12, DMEM/F12 и т.п.

Дополнительное руководство по конструированию и получению вирусных векторов для применения согласно изобретению можно найти в документах *Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 737. Merten and Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer); Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag ; Heilbronn R. and Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. In: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. Schäfer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R.O. Snyder and P. Moullier (Eds). 2011 Humana Press (Springer); Bünning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733; Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillón and A. Bosch (Eds.); Third Edition. 2014 Humana Press (Springer).*

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты или вирусный вектор, кодирующий GAT-1, как описано выше. Более конкретно, клетка-хозяин согласно изобретению представляет собой специфическую вирус-продуцирующую клетку, также называемую упаковывающей клеткой, которая трансфицирована конструкцией нуклеиновой кислоты или вирусным вектором, как описано выше, в присутствии хелперного вектора, или вируса, или других конструкций ДНК и обеспечивают *in trans* все недостающие функции, которые необходимы для полной репликации и упаковки вирусной частицы. Указанные упаковывающие клетки могут быть прикрепленными или суспензионными клетками.

Так, например, указанные упаковывающие клетки могут представлять собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, включая клетки обезьян, человека, собак и грызунов. Примерами клеток человека являются клетки PER.C6 (WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), клетки HEK-293 (ATCC CRL-1573), клетки HeLa (ATCC CCL2) и клетки легких плода резуса (ATCC CL-160). Примерами клеток приматов, не являющихся человеком, являются клетки Vero (ATCC CCL81), клетки COS-1 (ATCC CRL-1650) или клетки COS-7 (ATCC CRL-1651). Примерами клеток собак являются клетки MDCK (ATCC CCL-34). Примерами клеток грызунов являются клетки хомяков, такие как клетки ВНК21-F, клетки НКСС или клетки СНО.

В качестве альтернативы источникам млекопитающих, упаковывающие клетки для продуцирования вирусных частиц могут быть получены от птиц, таких как куры, утки, гуси, перепела или фазаны. Примеры клеточных линий птиц включают эмбриональные стволовые клетки птиц (WO01/85938 и WO03/076601), иммортализованные клетки сетчатки уток (WO2005/042728) и клетки, полученные из стволовых клеток птичьих эмбрионов, включая куриные клетки (WO2006/108846) или клетки уток, такие как клеточная линия EB66 (WO2008/129058 и WO2008/142124).

В другом варианте осуществления изобретения, клетки могут представлять собой любые упаковывающие клетки, допускающие бакуловирусную инфекцию и репликацию. В конкретном варианте осуществления изобретения, указанные клетки представляют собой клетки насекомых, такие как клетки SF9 (ATCC CRL-1711), клетки Sf21 (IPLB-Sf21), клетки MG1 (VTI-TN-MG1) или клетки High Five™ (VTI-TN-5B1-4).

Соответственно, в конкретном варианте осуществления изобретения, необязательно в комбинации с одним или более признаками различных вариантов осуществления изобретения, описанных выше или ниже, клетка-хозяин содержит:

конструкцию нуклеиновой кислоты или вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий GAT-1 человека, как описано в настоящей заявке,

конструкцию нуклеиновой кислоты, например, плазмиду, кодирующую гены AAV гер и/или сар, но не несущую последовательности ITR; и, необязательно,

конструкцию нуклеиновой кислоты, например, плазмиду или вирус, содержащие вирусные хелперные гены.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансдуцированной вирусной частицей, описанной в настоящей заявке, и используемый здесь термин «клетка-хозяин» относится к любой клеточной линии, которая чувствительна к заражению представляющим интерес вирусом и поддается культивированию *in vitro*.

Таким образом, в одном своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к плазмиде, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность,

кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит: i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанные в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 17 или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения вирусной частицы, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит: i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор

CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

- a. SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или
- b. SEQ ID NO: 3; или
- c. SEQ ID NO: 4; или
- d. SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанные в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или
- e. SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или
- f. SEQ ID NO: 8; или
- g. SEQ ID NO: 9; или
- h. SEQ ID NO: 10; или
- i. SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или
- j. SEQ ID NO: 14;

C) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична с SEQ ID NO: 17.

В одном варианте этого аспекта, клетка-хозяин дополнительно содержит:

конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно плазмиду, кодирующую гены AAV гер и/или сар, которые не несут последовательности ITR; и, необязательно

конструкцию нуклеиновой кислоты, например, плазмиду или вирус, содержащие вирусные хелперные гены;

где указанные гены гер и/или сар AAV кодируют капсидные белки i) AAVtt, а более предпочтительно, последовательность, содержащую SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно

на 98,5%, более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24 или ii) AAV9, а более предпочтительно, последовательность, содержащую SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO:25.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения вирусной частицы, где указанный способ включает стадию:

а. культивирования клетки-хозяина, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты; и

б. сбора вирусных частиц из культуральной среды клеток-хозяев и/или внутри клеток-хозяев;

где конструкция нуклеиновой кислоты содержит:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, или вирусный вектор, или вирусную частицу, или клетку-хозяин, описанные в настоящей заявке, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный Регуляторными органами или признанный Фармакопеей препарат, такой как препарат Европейской фармакопии, для введения животным и/или человеку. Термин «эксципиент» относится к разбавителю, адьюванту, носителю или наполнителю, вместе с которыми вводят терапевтическое средство.

При приготовлении фармацевтической композиции может быть использован любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997). Фармацевтические композиции обычно

являются стерильными и стабильными в условиях их приготовления и хранения. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде растворов (например, физиологического раствора, раствора декстрозы или буферного раствора или других фармацевтически приемлемых стерильных жидкостей), микроэмульсий, липосом или другой упорядоченной структуры, подходящей для обеспечения высокой концентрации продукта (например, микрочастиц или наночастиц). Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит, или хлорид натрия.

Предпочтительно, указанную фармацевтическую композицию изготавливают в виде раствора, а более предпочтительно, но необязательно, в виде забуференного физиологического раствора. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в фармацевтические композиции согласно изобретению. Руководство по совместному применению дополнительных терапевтических средств можно найти, например, в Справочнике по фармацевтике и в специальном Руководстве (CPS) Канадской ассоциации фармацевтов.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой композицию, подходящую для интрапаренхиматозного, интрацеребрального, внутривенного или интратекального введения. Эти фармацевтические композиции приводятся лишь в качестве примера и не ограничиваются ими, при этом, могут быть использованы и другие фармацевтические композиции, подходящие для парентерального и непарентерального введения. Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть расфасованы в виде унифицированных доз или в виде дробных лекарственных форм.

В одном своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно

выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанные в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который

дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно, последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В еще одном своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно, последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 35, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации от 5' к 3' с SEQ ID NO: 34; или

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV9, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 25; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно 5'ITR и последовательности 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит последовательности или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно, последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В еще одном своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV9, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 25; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который

дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В других вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, вирусный вектор или конструкцию нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке.

В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к описанной здесь вирусной частице, вирусному вектору или конструкции нуклеиновой кислоты для применения в терапии.

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к вирусной частице или к фармацевтической композиции, содержащей указанную вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr;

Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, промотор UbC, промотор PGK, промотор EF1a, промотор MECP2, промотор hNSE, промотор hSyn, промотор CamKII, промотор hDLX или эндогенный промотор SLC6A1 человека; где указанный промотор предпочтительно содержит:

SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

SEQ ID NO: 3; или

SEQ ID NO: 4; или

SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34;

SEQ ID NO: 8; или

SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 10; или

SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAVtt, а более предпочтительно, AAVtt, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV9, а более предпочтительно, AAV9, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO:

22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23; где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для ее применения в терапии.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно, последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

Предпочтительно, применение в терапии предназначено для лечения миоклонической атонической эпилепсии (МАЕ), МАЕ-подобной эпилепсии и других показаний при эпилепсии, таких как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрении или заболеваний, связанных с нарушением поглощения GABA, или их комбинаций.

В одном своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусной частице или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор

CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

- a. SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или
- b. SEQ ID NO: 3; или
- c. SEQ ID NO: 4; или
- d. SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 35, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или
- e. SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34
- f. SEQ ID NO: 8; или
- g. SEQ ID NO: 9; или
- h. SEQ ID NO: 10; или
- i. SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или
- j. SEQ ID NO: 14;

C) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAVtt, а более предпочтительно, AAVtt, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или
2. AAV9, а более предпочтительно, AAV9, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'I TR и 3'I TR, предпочтительно последовательности 5'I TR и 3'I TR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'I TR и 3'I TR, и где каждая из последовательностей 5'I TR и 3'I TR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'I TR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'I TR содержит SEQ ID NO: 23; где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для ее применения в лечении заболеваний, вызванных нарушением функции SLC6A1, и включающих моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия

(MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В одном своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусной частице или к фармацевтической композиции, содержащей указанную вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор содержит промотор PGK, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 4, или эндогенный промотор SLC6A1 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

3. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

4. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23; где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для ее применения в лечении заболеваний, вызванных нарушением функции SLC6A1, и включающих моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия

(MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации.

Предпочтительно последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к вирусной частице или к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или

последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для ее применения в лечении заболеваний, вызванных нарушением функции SLC6A1, и включающих моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met;

Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

- a. SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или
- b. SEQ ID NO: 3; или
- c. SEQ ID NO: 4; или
- d. SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 35, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или
- e. SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 8 или
- f. SEQ ID NO: 9; или
- g. SEQ ID NO: 10; или
- h. SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или
- i. SEQ ID NO: 14; и

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAVtt, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и

3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 4, или эндогенный промотор SLC6A1 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, а предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR

независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val;

Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; и

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

Используемые здесь термины «индивидуум» или «пациент», являются синонимами и относятся к млекопитающим. Виды млекопитающих, у которых может наблюдаться позитивный эффект от применения раскрытых здесь способов лечения или терапии, включают, но не ограничиваются ими, человека; приматов, не являющихся человеком, таких как человекообразные обезьяны, шимпанзе, мартышки и орангутанги; домашних животных, включая собак и кошек, а также домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы и козы, или другие виды млекопитающих, включая, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, хомяков и т.п. Предпочтительно, термин «индивидуум» или «пациент» относится к индивидууму-человеку или пациенту-человеку, а еще более предпочтительно, указанный индивидуум или пациент является новорожденным, младенцем, ребенком или подростком.

«Терапевтически эффективное количество» означает количество вирусных частиц (содержащих трансген), необязательно в фармацевтической композиции, или количество фармацевтической композиции, содержащей такие вирусные частицы, которое при его введении млекопитающему, пациенту или индивидууму дает желаемый терапевтический эффект, такой как один или более из следующих терапевтических эффектов:

- значительного уменьшения различных типов эпилептических припадков (таких как абсансы, атонические/«одноразовые приступы», миоклонические припадки, генерализованные припадки, простые парциальные припадки, фебрильные припадки, спазмы у детей или их комбинации);

- значительного достижения отсутствия припадков;

- значительного уменьшения задержки развития, нарушения речи, синдрома дефицита внимания и гиперактивности (ADHD), стереотипических признаков, признаков аутизма и атаксии.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, в целях приготовления лекарственного средства для лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор CAG, или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор EF1a, или промотор MECP2, или промотор hNSE, или промотор hSyn, или промотор CamKII, или промотор hDLX, или эндогенный человеческий промотор SLC6A1; где указанный промотор предпочтительно содержит:

- a. SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или
- b. SEQ ID NO: 3; или
- c. SEQ ID NO: 4; или
- d. SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или
- e. SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34 или
- f. SEQ ID NO: 8; или
- g. SEQ ID NO: 9; или
- h. SEQ ID NO: 10; или
- i. SEQ ID NO: 11, или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или
- j. SEQ ID NO: 14; и

C) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки AAV_{tt}, а более предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'TTR и 3'TTR, предпочтительно последовательности 5'TTR и 3'TTR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'TTR и 3'TTR, и где каждая из последовательностей 5'TTR и 3'TTR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'TTR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'TTR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к применению вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, в целях приготовления лекарственного средства для лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими

заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (МАЕ), МАЕ-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; где указанный промотор содержит промотор PGK, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 4, или эндогенный промотор SLC6A1 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR, предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR аденоассоциированного вируса, а более предпочтительно последовательности 5'ITR и 3'ITR, и где каждая из последовательностей 5'ITR и 3'ITR независимо содержит или состоит из последовательностей SEQ ID NO: 22 или 23 или последовательности, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22 и/или 23, где предпочтительно 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22, и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к применению вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, в целях приготовления лекарственного средства для лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия,

эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (МАЕ), МАЕ-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанная вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile; и

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном; и

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки:

1. AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или

2. AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, а более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно

98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

Вышеуказанные методы и способы применения являются особенно подходящими для лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (МАЕ), МАЕ-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, способы и применения, раскрытые в настоящей заявке, предпочтительно также предназначены для восстановления функции GAT-1, а более предпочтительно, для восстановления функции GAT-1 в GABA-эргических синапсах и/или в аксонах или в нейронах или в астроцитах.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, способы и применения, раскрытые в настоящей заявке, предпочтительно также предназначены для снижения частоты эпилептических припадков или для восстановления функции GAT-1 и снижения частоты эпилептических припадков.

Как описано в настоящей заявке, заболевание, вызванное нарушением SLC6A1, приводящим к моногенным эпилепсиям, таким как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями, эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (МАЕ), МАЕ-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, также может быть идентифицировано по известным генетическим мутациям.

В одном варианте осуществления изобретения, заболевание, вызванное нарушением SLC6A1, ассоциируется по меньшей мере с одной мутацией у пациента и приводит к образованию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций.

Используемый здесь термин «патологический вариант GAT-1» означает вариант GAT-1, обнаруженный в образцах у пациентов и идентифицированный с применением различных методов сбора данных, включая клиническое тестирование, исследование, и получение данных, где сообщается, что этот образец ассоциируется с патологическим фенотипом, таким как любое из следующих заболеваний: моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом

развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (МАЕ), МАЕ-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения ГАВА, или их комбинации.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанная мутация включает, по сравнению с SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинаций.

Эти мутации также проиллюстрированы в Таблице 2А и Таблице 2В далее в разделе «Примеры».

Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к вирусной частице или к фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1; или iii) встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки: i)

AAVtt, а более предпочтительно, AAVtt, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или ii) AAV9, а более предпочтительно, AAV9, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25,

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR; где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для лечения заболеваний, вызванных нарушением SLC6A1, включая моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанное заболевание вызвано нарушением функции SLC6A1, ассоциируется по меньшей мере с одной мутацией у пациента и приводит к образованию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций, и где указанная мутация предпочтительно включает, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинаций.

В другом варианте осуществления изобретения, вирусная частица или фармацевтическая композиция содержит вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, где вирусная частица содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор представляет собой промотор PGK, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 4, или эндогенный промотор SLC6A1 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки: i) AAVtt, а более предпочтительно, AAVtt, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно

на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или ii) AAV9, а более предпочтительно, AAV9, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR; где вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая вирусную частицу, предназначена для лечения заболеваний, вызванных нарушением SLC6A1, включая моногенные эпилепсии, такие как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанное заболевание вызвано нарушением функции SLC6A1, ассоциируется по меньшей мере с одной мутацией у пациента и приводит к образованию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций, и где указанная мутация предпочтительно включает, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинаций.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно, последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно 98,5%, более предпочтительно 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA, или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами,

разбавителями или носителями, включающую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15, или последовательность, кодирующую GAT-1 человека, где GAT-1 человека содержит i) SEQ ID NO: 18, 19 или 20; или ii) последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функциональность GAT-1;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки: i) AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или ii) AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR; где указанное заболевание вызвано нарушением функции SLC6A1, ассоциируется по меньшей мере с одной мутацией у пациента и приводит к продуцированию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций, и где указанная мутация предпочтительно включает, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинации.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения моногенных эпилепсий, таких как моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими заболеваниями, ранним началом развития и эпилептическими энцефалопатиями; эпилептическая энцефалопатия, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническая атоническая эпилепсия (MAE), MAE-подобные и другие проявления эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрения или заболевания, связанные с нарушением поглощения ГАВА, или их комбинации, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вирусной частицы или фармацевтической композиции, содержащей вирусную частицу в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями, включающую конструкцию нуклеиновой кислоты,

содержащую:

А) трансген, кодирующий GAT-1 человека; где указанный трансген содержит SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а предпочтительно SEQ ID NO: 15;

В) промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор представляет собой промотор PGK, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 4, или эндогенный промотор SLC6A1 человека, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 14;

С) последовательность сигнала полиаденилирования;

где указанная вирусная частица предпочтительно содержит капсидные белки: i) AAV_{tt}, а более предпочтительно, AAV_{tt}, содержащего SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24; или ii) AAV₉, а более предпочтительно, AAV₉, содержащего SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 25;

где указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, который дополнительно содержит последовательности 5'ITR и 3'ITR; где указанное заболевание вызвано нарушением функции SLC6A1, ассоциируется по меньшей мере с одной мутацией у пациента и приводит к продуцированию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций, и где указанная мутация предпочтительно включает, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинации.

Предпочтительно, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность сигнала полиаденилирования SV40, более предпочтительно последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, предпочтительно на 98,5%, а более предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 17.

Описанные здесь способы лечения и применения могут быть использованы в комбинации с вальпроатом и любыми другими известными в настоящее время потенциальными противосудорожными препаратами (ПЭП), а также с нейромодуляторными методами лечения (стимуляции блуждающего нерва, стимуляции глубоких отделов головного мозга) и вместе с кетогенными диетами или т.п.

Дозы при терапии, включающей введение вирусной частицы или ее композиции, дополнительно включающей один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей согласно изобретению, могут быть определены в соответствии с различными параметрами, а в частности, в зависимости от возраста, массы

тела и состояния здоровья пациента, проходящего лечение; способа введения; и необходимой схемы введения. Врач сможет самостоятельно определить необходимый способ введения и дозировку для любого конкретного пациента.

Конструкции нуклеиновых кислот, вирусные векторы, вирусные частицы или фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены, но необязательно, с использованием специального устройства для введения в головной мозг и/или спинномозговую жидкость (CSF) пациента. Доставка в головной мозг может быть выбрана из внутримозговой доставки, внутривентрикулярной доставки, интракортикальной доставки, доставки в гиппокамп, доставки в скорлупу, доставки в мозжечок и их комбинаций. Доставка в спинномозговую жидкость может быть выбрана из доставки вовнутрь большой цистерны, интратекальной доставки, внутрижелудочковой доставки (ICV) и их комбинаций. Доставка в головной мозг и/или спинномозговую жидкость (CSF) пациента может быть осуществлена путем инъекции. Инъекция в головной мозг может быть выбрана из внутримозговой инъекции, внутривентрикулярной инъекции, интракортикальной доставки, доставки в гиппокамп, доставки в скорлупу, доставки в мозжечок и их комбинаций. Доставка в спинномозговую жидкость может быть выбрана из инъекции вовнутрь большой цистерны, интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции и их комбинаций.

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

Последовательности, включенные в настоящее изобретение, представлены в Таблице 1:

Таблица 1

Идентификатор и название последовательно сти	Последовательность
SEQ ID NO: 1, промотор CAG 1,6 т.п.о.	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT

	<p>ATTACCATGCGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC CCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTAT TTTTAAATTATTTTATGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGG GGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGC GGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGCG</p>
<p>SEQ ID NO: 2 Химерный интрон (СВА+RbG)</p>	<p>GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCG CCTCGCGCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCC ACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCCTCCGGGCTGTA ATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCT GCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCTTTGTGCGGG GGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGG GAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGC TCGGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCG AGGGGAGCGCGGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGG GGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGT GGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGT AACCCCCCTGGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGG CCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGG GCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGC CGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGG GAGGGGCGCGGCGGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGC GCGGCGAGCCGACGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAG AGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGA AATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGC GAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG GCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCA GCCTCGGGGCTGCCGACGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG ACGGGGACAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGG CTTTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCC TACAG</p>
<p>SEQ ID NO: 3 Промотор UbC</p>	<p>GGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCC TCGTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGG AGCGTCCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCC</p>

	<p>GCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCAGCAGA AGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGG TTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCC TTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAAC GCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAG TTCCGTTCGCAGCCGGGATTTGGGTTCGCGGTTCTTGTTTGTGGA TCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGCTGGGCTG GCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAA GCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGA GCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGGGGGAGCGCAGCAA AATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCTTGTGA GGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGT GGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGCCCTTCGCTAATGCGG GAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGCACCATCTGGG GACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGTTT GTCGTCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGGCGGTGCCGTTGGG CAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCCTCGTCGTGTC GTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGC CACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTTCGCAGG ACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAG GCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCA GTTTCTTTGGTTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGA AGCTCCGGTTTTTGAAGTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTT TTGTGAAGTTTTTTAGGCACCTTTTCAAATGTAATCATTGTTGGG TCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTTGTAATTGTCCGCTA AATTCTGGCCGTTTTTTGGCTTTTTTGTAGAC</p>
<p>SEQ ID NO: 4 Промотор PGK</p>	<p>ACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCG CGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTCCCCCCCCGC CCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGC ACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCA ATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCAATAGCAGCT TTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGG GTCCGGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGGCGG GCGCCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTC AAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCC</p>

	GGGCCTTTCG
SEQ ID NO: 5 Промотор EF1a плюс интрон	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATG TCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC CGTATATAAGTGC ACTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTC CCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCT TGAATTA CTTCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTCGTGGCCTTGCG CTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGTGGCCTGGCC TGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCG CGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC TTGTAAATGCGGGCCAAGATCAGCACACTGGTATTTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCA CATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGA ATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGCCCGGCCTGCTCTGGTG CCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCA AGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG GCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCACAAAATGGAGGAC GCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA GGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTC CACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC CAGCTTTTGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTT GCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA CAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGA
SEQ ID NO: 6 Интрон EF1a	GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGG GTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTA CTTCACCTGGCTGCA GTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTG GGAGAGTTCGTGGCCTTGC GCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGTGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT GCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGAT

	<p>AAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGC TTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCA GCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGGCGACGG GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCT GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGCCCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTAT CGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAAGT TGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGG GAGCACAAAATGGAGGACGCGGGCCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGGTCCTCAG CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA GGCACCTCGATTAGTTCTCCAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTT AGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACAC TGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGT TCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCC ATTCAG</p>
<p>SEQ ID NO: 7 Промотор MECP2</p>	<p>AGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAG GAACTCCTGCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCC CAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACAC AGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGG GTCCCGGCATCGGTTGCGCGC</p>
<p>SEQ ID NO: 8 Промотор hNSE</p>	<p>ATGCAGCTGGACCTAGGAGAGAAGCAGGAGAGGAAGATCCA GCACAAAAAATCCGAAGCTAAAAACAGGACACAGAGATGGG GGAAGAAAAGAGGGCAGAGTGAGGCAAAAAGAGACTGAAG AGATGAGGGTGGCCGCCAGGCACTTTAGATAGGGGAGAGGC TTTATTTACCTCTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTCGAGGTAGTCTTGCTTAGTCTCCAGGCTGGAGTGCAGTG GCACAATCTCAGCTCACTGCAACTTCCACCTCCTGGGTTCAAG CAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGG CGCATGCAACCGCGCCTGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAA ACGGGGTTTACCACGTTAGCCAGGATGGTCTGGATCTCCTG ACCTCGTGATCTGCCCCGCTCCGCCTTCCAAAGTGCTGGGATT ACAGGGGTGAGCCACAGCGCCTGGTCCCTATTTACTTCTGTCT</p>

	<p>TCTACCTCCAGGAGATCAAAGACGCTGGCCTTCAGACCTGAT CAGACTCCCAGGGGCAGCCACCACATGTATGACAGAGAACA GAGGATGCCTGTTTTTGCCCCAAAGCTGGAAATTCATCACA CCTGAGGCCAGGATCTGCTCTGTGCCGGTCTCTGGGCAGT GTGGGGTGCAGAATGGGGTGCCTAGGCCTGAGCGTTGCCTGG AGCCTAGGCCGGGGGCCGCCCTCGGGCAGGCGTGGGTGAGA GCCAAGACCGCGTGGGCCGCGGGGTGCTGGTAGGAGTGGTTG GAGAGACTTGCGAAGGCGGCTGGGGTGTTTCGGATTTCCAATA AAGAAACAGAGTGATGCTCCTGTGTCTGACCGGGTTTGTGAG ACATTGAGGCTGTCTTGGGCTTCACTGGCAGTGTGGGCCTTCG TACCCGGGCTACAGGGGTGCGGCTCTGCCTGTTACTGTGAG TGGGTCGGGCCGTGGGTATGAGCGCTTGTGTGCGCTGGGGCC AGGTCGTGGGTGCCCCACCCTTCCCCATCCTCCTCCCTTCC CCACTCCACCCTCGTCGGTCCCCACC CGCCTCGTACGTGCG CCTCCGCCGGCAGCTCCTGACTCATCGGGGGCTCCGGGTAC ATGCGCCCGCGCGGCCCTATAGGCGCCTCCTCCGCCCGCCGC CCGGGAGCCGCAGCCGCCGCCACTGCCACTCCCGCTCTC TCAGCGCCCGCGTCCGCCACCGCCACCGCCACCGCCACTACCA CCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTT GGTAAAGCC</p>
<p>SEQ ID NO: 9 Промотор hSyn</p>	<p>AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGG GTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACC CAACCCCATTTCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGG GGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCA GCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGC GCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCA CTCGCCGGTCCCCCGAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTC GCGTCCGCGCCGCCGCCGCCAGCCGGACCGCACACGCGA GGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGC GGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGC GGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG</p>
<p>SEQ ID NO: 10 Промотор CamKII</p>	<p>CATTATGGCCTTAGGTCACTTCATCTCCATGGGGTTCTTCTTC TGATTTTCTAGAAAATGAGATGGGGGTGCAGAGAGCTTCCTC AGTGACCTGCCAGGGTCACATCAGAAAATGTCAGAGCTAGAA CTTGAACCTCAGATTAATAATCTTAAATTCCATGCCTTGGGGGC</p>

	<p>ATGCAAGTACGATATACAGAAGGAGTGAACCTCATTAGGGCA GATGACCAATGAGTTTAGGAAAGAAGAGTCCAGGGCAGGGT ACATCTACACCACCCGCCAGCCCTGGGTGAGTCCAGCCACG TTCACCTCATTATAGTTGCCTCTCTCCAGTCCTACCTTGACGG GAAGCACAAGCAGAAACTGGGACAGGAGCCCCAGGAGACCA AATCTTCATGGTCCCTCTGGGAGGATGGGTGGGGAGAGCTGT GGCAGAGGCCTCAGGAGGGGCCCTGCTGCTCAGTGGTGACAG ATAGGGGTGAGAAAGCAGACAGAGTCATTCCGTCAGCATTCT GGGTCTGTTTGGTACTTCTTCTCACGCTAAGGTGGCGGTGTGA TATGCACAATGGCTAAAAGCAGGGAGAGCTGGAAAGAAAC AAGGACAGAGACAGAGGCCAAGTCAACCAGACCAATTCCCA GAGGAAGCAAAGAAACCATTACAGAGACTACAAGGGGGAAG GGAAGGAGAGATGAATTAGCTTCCCCTGTAAACCTTAGAACC CAGCTGTTGCCAGGGCAACGGGGCAATACCTGTCTCTTCAGA GGAGATGAAGTTGCCAGGGTAACTACATCCTGTCTTTCTCAA GGACCATCCCAGAATGTGGCACCCACTAGCCGTTACCATAGC AACTGCCTCTTTGCCCACTTAATCCCATCCCGTCTGTAAAA GGGCCCTATAGTTGGAGGTGGGGGAGGTAGGAAGAGCGATG ATCACTTGTGGACTAAGTTTGTTCGCATCCCCTTCTCCAACCC CCTCAGTACATCACCTGGGGGAACAGGGTCCACTTGCTCCT GGGCCACACAGTCCTGCAGTATTGTGTATATAAGGCCAGGG CAAAGAGGAGCAGGTTTTAAAGTGAAAGGCAGGCAGGTGTT GGGGAGGCAGTTACCGGGGCAACGGGAACAGGGCGTTTCGG AGGTGGTTGCCATGGGGACCTGGATGCTGACGAAGGCTCGCG AGGCTGTGAGCAGCCACAGTGCCCTGCTCAGAAGCCCCAAGC TCGTCAGTCAAGCCGTTCTCCGTTTGCCTCAGGAGCACGG GCAGGCGAGTGGCCCCTAGTTCTGGGGGCAGC</p>
<p>SEQ ID NO: 11 Промотор hDLX</p>	<p>TTCAGAATGTTATGCACTCACAGTGGTTTGGCATGCATCTGGT GAATTTTTTTTAAACGAAAAATTAGTGTTGGTTTCGATGTATGG TAGCATTCTCCCTAACGTAATTTGAATAATTCAGCAAAGCCCC ACTACCAGCTGTA CTCTGCAGCCTCTTCCATTCTTTTCAGCA TTATAATTTTGGTTAATTTTCAATTTTAGGTCCTACGTCTCTGC AATTTGTGTATGAATAACAGAATAATTTCCCTCTTTTGTTCG CCTTTCCTGTTCCCTGAATCTAAATAAAGATGGCTTTTTAGTAT TAAAAGTGGAAGAAAATTACAGGTAATTATCTTTGACGGTAA</p>

	AAACGCTGTAATCAGCGGGCTACATGAAAAATTA CTCTAATT ATGGCTGCATTTAAGAGAATGGAAAAAACCTTCTTGTGGAT AAAAACCTTAAATTGTCCCCAATGTCTGCTTCAAATTGGATG GCACTGCAGCTGGAGGCTTTGTTTCAGAATTGATCCTGGGGAG CTACGAACCCAAAGTTTCACAGTAGGAAG
SEQ ID NO: 12 pB-Глобин	CTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATT TGCTTCT
SEQ ID NO: 13 Интрон hDLX	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAG AAACTGGGCTTGTTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGA TAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCT CCACAG
SEQ ID NO: 14 Эндогенный промотор hSLC6A1	AGAATCCCTCAAACCTCAAGAACTGAGAGAAGGGTGTCTGGG GCTCCTGCCACCATCCCTGTTTCCCTTTTAAGTAATCTGTTTCC CCATCTGTCCATCCATACACACAGCCACTTGTGTCTCCATGAC CAACCGCTGGCAGTGGAAGGGTGTCTTCCCACCCCACTCT TACACACACTCCCAGCTGGTACCCAGAGCCTGGTCACCCAG GCCAGGCCTGTGTTTCCAGGTGTAACGGGCAGCAGACGCTGC CCTAGGACTAGAGCAGGGAGGGGGCACGGGCCACCCCAAC CCACAGCGACCCACAGAGGGCGAAAAGAGGACGACCGCAGA GAGAAACGGAAAGGACAGGCCAACGGAAGCAGTACTGCAAG GCTGGAAGGAGAAAAGCCAGGAGGGGAGTGCTTGCTGTGAA AGACAGGGAGACAGAGACCAAGACGGACAGGCAGACAGGCT GGTGACCCAGGATGAGGCCGAAAGAGCCATCAAAGGAAGG AGAAGGAAGGAGAGAGATTGGAGCGGGACGGCGGGGCAGG CGAGGGAAGGAGGGGGTGGGGAGAGGGAGGGAGGAAGAGA GGGGAGAAAGAGGGAGGAAGAGAGGGGAGAAGGAGGGAGA AGAGAGCGGGAGAATGCGAGAGGAAAGAAGGGAGAGGGGA GGCGTAGAAGGGGAGAGGAGGTGAAGGGAAAAGGAGAGAG CCTGCTGGCGGCGAAGCTGCAAGAGGCAGCTGCGGAGGGAG CGCGCGGCGGGCCTGGGGGAGCGCTGGGCGGGGGCGGGCGG TGCGGGCAGGGCTATACCCGAGCTGGGCGGGCTCCGGGCGCC GCGGGCCCTGCCCTCCCCCTCCATCCCTCCGGACTCGCTCCCC CCTCCTCTCCCTTCCCCGCGACCCTCCGCCCGCCCTCGGAAGA CCGAGACAGCGGAGAGGTTGCGGGTGAGCTGCGCTGAGCCC AGGAGCCGAGGAGTCGGGAGCGCAGTAGCGCTGAGCCCGAG

	<p>CCCGAGCGGCCCGCGTCCCGAGCGCATCGGAGCGGCCGAGC CGCCCGGATGCAGCGCCTGTCCCGGGCAGCGCAGCCCCGGCC GCAGGATCTCACCCAGGGTGGCAGAAGGAGGCCTTCTGGAGC TGACCCACCCCGACGACCATCAGGGTGAGGCAACTCCAAGG TCCTACTCTCTTTCTGTGCCTGTTACCCACCCCGTCCTCCTAGG GTGCCCTTGAGCCGCAAACTGCTGTCCACGTGGACCGGGGG TGACATCGCACGTCCATCTGCCAGGACCCCTGCGTCCAAATT CCGAGAC</p>
<p>SEQ ID NO: 15 человеческий SLC6A1 NCBI NM_003042.4 (вариант транскрипта 1)</p>	<p>ATGGCGACCAACGGCAGCAAGGTGGCCGACGGGCAGATCTC CACCGAGGTCAGCGAGGCCCTGTGGCCAATGACAAGCCCAA AACCTTGGTGGTCAAGGTGCAGAAGAAGGCGGCAGACCTCCC CGACCGGGACACGTGGAAGGGCCGCTTCGACTTCCTCATGTC CTGTGTGGGCTATGCCATCGGCCTGGGCAACGTCTGGAGGTT CCCCTATCTCTGCGGGAAAAATGGTGGGGGAGCCTTCCTGAT CCCCTATTTCTGACACTCATCTTTGCGGGGGTCCCCTCTTC CTGCTGGAGTGCTCCCTGGGCCAGTACACCTCCATCGGGGGG CTAGGGGTATGGAAGCTGGCTCCTATGTTCAAGGGCGTGGGC CTTGCGGCTGCTGTGCTATCATTCTGGCTGAACATCTACTACA TCGTCATCATCTCCTGGGCCATTTACTACCTGTACAACCTCCTT CACCACGACACTGCCGTGGAAACAGTGCGACAACCCCTGGAA CACAGACCGCTGCTTCTCCAACACTACAGCATGGTCAACACTAC CAACATGACCAGCGCTGTGGTGGAGTTCTGGGAGCGCAACAT GCATCAGATGACGGACGGGCTGGATAAGCCAGGTCAGATCC GCTGGCCACTGGCCATCACGCTGGCCATCGCCTGGATCCTTGT GTATTTCTGTATCTGGAAGGGTGTGGCTGGACTGGAAAGGT GGTCTACTTTTCAGCCACATAACCCCTACATCATGCTGATCATC CTGTTCTTCCGTGGAGTGACGCTGCCCGGGGCCAAGGAGGGC ATCCTCTTCTACATCACACCCAACCTCCGCAAGCTGTCTGACT CCGAGGTGTGGCTGGATGCGGCAACCCAGATCTTCTTCTCAT ACGGGCTGGGCCTGGGGTCCCTGATCGCTCTCGGGAGCTACA ACTCTTTCCACAACAATGTCTACAGGGACTCCATCATCGTCTG CTGCATCAATTCGTGCACCAGCATGTTTCGCAGGATTCGTCATC TTCTCCATCGTGGGCTTCATGGCCCATGTCACCAAGAGGTCCA TTGCTGATGTGGCGGCCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTCCTGG CATACCCAGAGGCGGTGACCCAGCTGCCTATCTCCCCACTCT</p>

	<p>GGGCCATCCTCTTCTTCTCCATGCTGTTGATGCTGGGCATTGA CAGCCAGTTCTGCACTGTGGAGGGCTTCATCACAGCCCTGGT GGATGAGTACCCAGGCTCCTCCGCAACCGCAGAGAGCTCTT CATTGCTGCTGTCTGCATCATCTCCTACCTGATCGGTCTCTCT AACATCACTCAGGGGGGTATTTATGTCTTCAAACCTCTTTGACT ACTACTCTGCCAGTGGCATGAGCCTGCTGTTCCCTCGTGTTCTT TGAATGTGTCTCTATTTCCCTGGTTTTACGGTGTCAACCGATTC TATGACAATATCCAAGAGATGGTTGGATCCAGGCCCTGCATC TGGTGGAACCTCTGCTGGTCTTTCTTCACACCAATCATTGTGG CGGGCGTGTTCATTTTAGTGCTGTGCAGATGACGCCACTCAC CATGGGAAACTATGTTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGTGTGGG CTGGCTGATGGCTCTGTCTTCCATGGTCCTCATCCCCGGGTAC ATGGCCTACATGTTCCCTCACCTTAAAGGGCTCCCTGAAGCAG CGCATCCAAGTCATGGTCCAGCCAGCGAAGACATCGTTCCG CCAGAGAATGGTCCTGAGCAGCCCCAGGCGGGCAGCTCCACC AGCAAGGAGGCCTACATCTAG</p>
<p>SEQ ID NO: 16 Мышиный SLC6A1</p>	<p>ATGGCGACTGACAACAGCAAGGTGGCTGATGGGCAGATCTCT ACTGAGGTCAGCGAGGCCCTGTGGCCAGCGACAAGCCCAA AACCCCTGGTAGTCAAGGTGCAGAAGAAGGCCGGGGACCTCC CTGACCGGGACACATGGAAGGGACGCTTCGACTTCCTCATGT CCTGCGTGGGCTATGCCATCGGCCTGGGCAATGTGTGGAGGT TCCCTTACCTCTGTGGGAAAACGGTGGCGGGGCCTTCCTAA TCCCATATTTCTGACGCTCATCTTTGCGGGTGTTCCTCTCTTC CTTTTGGAGTGCTCCCTAGGCCAGTACACCTCCATTGGGGGCC TGGGCGTATGGAAGCTGGCGCCCATGTTCAAGGGTGTGGGCC TCGCGGCAGCTGTGCTGTCCTTCTGGCTGAACATCTACTACAT CGTCATCATCTCCTGGGCCATCTACTACCTGTACAACCTCCTC ACCACGACCCTGCCATGGAAACAGTGTGACAACCCGTGGAAC ACTGACCGCTGCTTCTCCAACCTACAGCCTGGTCAATACCACC AACATGACCAGCGCCGTGGTGGAGTTCTGGGAGCGCAACATG CACCAGATGACAGATGGACTGGACAAGCCAGGACAGATCCG CTGGCCTCTGGCCATCACACTGGCCATTGCCTGGGTGCTCGTG TATTTCTGCATCTGGAAGGGTGTGGTTGGACTGGAAAGGTG GTCTACTTCTCAGCCACGTACCCCTACATCATGCTTATCATCC TGTTCTTCCGTGGAGTGACGCTTCCCGGGGCCAAGGAGGGGA</p>

	<p>TCCTCTTCTACATCACACCCAACTTCCGAAAGCTGTCTGATTC TGAGGTGTGGCTTGACGCCGCCACCCAGATCTTCTTCTCCTAC GGGCTGGGCCTGGGGTCCCTGATTGCTCTGGGAAGCTACAAC TCTTTCCACAACAATGTGTACAGGGACTCCATCATCGTTTGCT GCATCAACTCCTGCACCAGCATGTTTGCCGGATTCGTCATCTT CTCCATCGTGGGCTTCATGGCTCATGTCACCAAGAGGTCCAT AGCTGATGTGGCAGCCTCAGGCCCGGGGCTGGCATTCTTGGC GTACCCTGAGGCTGTGACACAGCTACCCATCTCTCCCCTCTGG GCTATCCTCTTCTTCTCCATGCTGCTGATGCTGGGCATTGACA GCCAGTTCTGTACCGTGGAGGGCTTCATCACTGCCCTGGTGG ACGAGTACCCAGACTTCTCCGCAATCGCCGTGAACCTTTCAT TGCTGCCGTGTGCATCGTGTCTACCTGATTGGCCTGTCTAAC ATCACCCAGGGTGGCATTATGTCTTCAAACCTGTTTGATTATT ACTCTGCCAGCGGCATGAGCTTGCTGTTCTGGTTTTCTTCGA GTGTGTCTCCATTTCTGGTTTTATGGTGTCAACCGGTTCTAT GACAACATCCAGGAGATGGTTGGCTCCAGGCCCTGCATCTGG TGGAAGCTGTGCTGGTCCTTTTTACACCCATCATTGTGGCGG GCGTGTCTTCTTTCAGTGCTGTGCAGATGACACCACTCACCAT GGGAAGCTATGTTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGCGTGGGCTG GCTCATGGCTCTGTCTCCATGGTGCTCATCCCCGGGTACATG GCTTACATGTTCTCACCTGAAGGGCTCCCTGAAGCAGCGT CTCCAGGTCATGATTCAGCCCAGTGAAGATATTGTGCGCCCT GAGAATGGCCCTGAGCAGCCGCAGGCTGGCAGCTCAGCCAG CAAGGAGGCCTACATCTAG</p>
SEQ ID NO: 17 SV40 poly A	<p>GATCCAGACATGATAAGATAATTGATGAGTTTGGACAAACC ACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATT TGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATA ACAAGTT</p>
SEQ ID NO: 18 Человеческий GAT-1, изоформа a	<p>MATNGSKVADGQISTEVSEAPVANDKPKTLVVKVQKKAADLPD RDTWKGRFDLMSVGYAIGLGNVWRFPYLCGKNGGGAFLIPY FLTLIFAGVPLFLLECSLGQYTSIGGLGVWKLAPMFKGVGLAAA VLSFWLNIYYIVIISWAIYYLYNSFTTTLPWKQCDNPWNTDRCFS NYSMVNTTNMTSAVVEFWERNMHQMTDGLDKPGQIRWPLAIT LAIAWILVYFCIWKGVGWTKVVYFSATYPYIMLILFFRGVTLP GAKEGILFYITPNFRKLSSEVWLDAATQIFFSYGLGLGSLIALGS</p>

	<p>YNSFHNNVYRDSIIVCCINSCTSMFAGFVIFSIVGFMAHVTKRSIA DVAASGPGLAFLAYPEAVTQLPISPLWAILFFSMLLMGIDSQFC TVEGFITALVDEYPRLLRNRRELFIAAVCIISYLIGLSNITQGGIYV FKLFDYYSASGMSLLFLVFFECVSISWFYGVNRFYDNIQEMVGS RPCIWWKLCWSFFTPIIVAGVFIFSAVQMTPLTMGNYVFPKWGQ GVGWLMASSMVLIPGYMAYMFLTLK GSLKQRIQVMVQPSDIVRPENGPEQPQAGSSTSKEAYI</p>
<p>SEQ ID NO: 19 Человеческий GAT-1, изоформа b</p>	<p>MVNTTNMTSAVVEFWERNMHQMTDGLDKPGQIRWPLAITLAI AWILVYFCIWKGVGWTGKVVYFSATYPYIMLILFFRGVTLPGA KEGILFYITPNFRKLSDEVLDAATQIFFSYGLGLGSLIALGSYN SFHNNVYRDSIIVCCINSCTSMFAGFVIFSIVGFMAHVTKRSIADV AASGPGLAFLAYPEAVTQLPISPLWAILFFSMLLMGIDSQFCTV EGFITALVDEYPRLLRNRRELFIAAVCIISYLIGLSNITQGGIYVFK LFDYYSASGMSLLFLVFFECVSISWFYGVNRFYDNIQEMVGSRP CIWWKLCWSFFTPIIVAGVFIFSAVQMTPLTMGNYVFPKWGQG VGWLMALSSMVLIPGYMAYMFLTLK GSLKQRIQVMVQPSDIV RPENGPEQPQAGSSTSKEAYI</p>
<p>SEQ ID NO: 20 Человеческий GAT-1, изоформа c</p>	<p>MVNTTNMTSAVVEFWERNMHQMTDGLDKPGQIRWPLAITLAI AWILVYFCIWKGVGWTGKVVYFSATYPYIMLILFFRGVTLPGA KEGILFYITPNFRKLSDEVLDAATQIFFSYGLGLGSLIALGSYN SFHNNVYRDSIIVCCINSCTSMFAGFVIFSIVGFMAHVTKRSIADV AASGPGLAFLAYPEAVTQLPISPLWAILFFSMLLMGIDSQFCTV EGFITALVDEYPRLLRNRRELFIAAVCIISYLIGLSNITQGGIYVFK LFDYYSASGMSLLFLVFFECVSISWFYGVNRFYDNIQEMVGSRP CIWWKLCWSFFTPIIVAGVFIFSAVQMTPLTMGNYVFPKWGQG VGWLMALSSMVLIPGYMAYMFLTLK GSLKQRIQVMVQPSDIV RPENGPEQPQAGSSTSKEAYI</p>
<p>SEQ ID NO: 21 Последовательность ДНК AAV9.hu14</p>	<p>AGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAATTGCAATTTATTCA TATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTG TAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGG CAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATC AATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCA AGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAT GGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCC AGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAC</p>

CGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGGGCGAAATACGC
GATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAGTGCA
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCAC
CTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCC
GGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACG
GATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAAATTCCGTCAG
CCAGTTTLAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACG
CTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCT
TCCCATACAAGCGATAGATTGTTCGCACCTGATTGCCCGACAT
TATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTT
GGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTC
ATATTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAA
ATAAACAAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTC
TGAACATTATCGCGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATA
ACACCCCTTGTTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCAC
CTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCG
ATGGTAGTGTGGGGACTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACCTGCC
AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGC
CTTTCGCCC GGCTAATTAGGGGGTGTGCGCCCTTCGCTGAAGT
CCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTTCGAC
ACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGC
AGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGC
CATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGA
CCTTGACGAGCATCTGCCC GGCAATTTCTGACAGCTTTGTGAAC
TGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGAC
ATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCC
GAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTG
AGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAG
GGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAAACCACC
GGGGTGAAATCCATGGTTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATT
CGCGAAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCG
ACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGGC
GCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCC
CAATTA CTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGC

GTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCT
CACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGT
GTCGCAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCA
ATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGT
ACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCT
CGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATAACATCT
CCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTG
CCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCG
CCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTT
CCAGCAATCGGATTTATAAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACG
ATCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGA
AAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTG
CAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCAC
ACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAAC
TTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGG
GAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAA
AGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAAT
GCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCA
CCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAA
CGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCA
AATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGG
TCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGG
ATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGG
GTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATA
AGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCG
ACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGGACAGGTA
CCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCT
GTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGACTGAATCAGAATTCAA
TATCTGCTTCACTCACGGTGTCAAAGACTGTTTAGAGTGCTTT
CCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCG
TATCAGAACTGTGCTACATTCATCACATCATGGGAAAGGTG
CCAGACGCTTGCACTGCTTGGCAGCTGGTCAATGTGGACTTG
GATGACTGTGTTTCTGAACAATAAATGACTTAAACCAGGTAT
GGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCT
TAGTGAAGGAATTCGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGC

CCCTCAACCCAAGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCG
AGGTCTTGTGCTTCCGGGTACAAATACCTTGGACCCGGCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGCAGCAGACGCGG
CGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAG
GCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCC
GAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGC
AACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGCTTCTT
GAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCT
GGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGA
CTCCTCCGCGGGTATTGGCAAATCGGGTGACAGCCCGCTAA
AAAGAGACTCAATTTCCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAGT
CCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTC
AGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACC
AGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTT
CCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCAATGGCTGGGGGACA
GAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCT
ACAACAATCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTG
GAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGCACCC
CCTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTC
ACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATT
CCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGT
CAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCATCGCCA
ATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTACGGACTCAGACT
ATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCC
TCCCGCCGTTCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGG
GTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCGTTT
GTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCGTCGCAAATGCTAAGA
ACGGGTAACAACCTTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAACGTA
CCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACCGA
CTAATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAA
AGACTATTAACGGTTCTGGACAGAATCAACAAACGCTAAAAT
TCAGTGTGGCCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAA
ACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAA
CCACTGTGACTCAAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCCTG
GAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAA

TCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACC
GTTTCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTGGCAAACAAGG
AACTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAA
CCAACGAAGAAGAAATTA AAACTACTAACCCGGTAGCAACG
GAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAA
GCACAGGCGCAGACCCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGAATACTT
CCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGA
CCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTCAC
CCTTCTCCGCTGATGGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCCT
CCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCT
CCAACGGCCTTCAACAAGGACAAGCTGAACTCTTTCATCACC
CAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAG
CTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCA
GTACACTTCCA ACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCT
GTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGC
ACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAAT
AAACCGTTTAATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGCGT
CAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAATGCATAATAAATA
CTGATAACATCTTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTG
ACATGTATAATTTTGATATCAAAA ACTGATTTTCCCTTTATTA
TTTTCGAGATTTATTTTCTTAATTCTCTTTAACA AACTAGAAA
TATTGTATATACAAAAAATCATAAATAATAGATGAATAGTTT
AATTATAGGTGTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTT
AAAGTGCGTTGCTTTTTTCTCATTATAAGGTTAAATAATTCT
CATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAATATTCTGAC
AAATGCTCTTTCCTAAACTCCCCCATAAAAAA ACCCGCCG
AAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTA
TCAGAACCGCCCAGGGGGCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGT
TTTACAACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCAT
CCGTCAGGGGCCTTCTGCTTAGTTTGTATGCCTGGCAGTTCCT
ACTCTCGCCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
GTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG
GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC

	<p>TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC GAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTG GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT TTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCG TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGC CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG AGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAA CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGACGCGCGCGTAACTCACGTT AAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAG CGTAATGCTCTGCTT</p>
SEQ ID NO: 22 5' ITR	<p>AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GC</p>
SEQ ID NO: 23 3' ITR	<p>GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTC CT</p>
SEQ ID NO: 24 AAV природного типа (AAVtt)	<p>MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSR GLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDS GDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEP LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQPARKRLN FGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMASGSGAPMADNN EGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLY KQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLIN NNWGRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRL</p>

	<p>MNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNW LPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVP GPAMASHKDDEEKYFPQSGVLIFGKQDSGKTNDIEKVMITDEE EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVW QDRDVYLVQPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNT PVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP EIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL</p>
<p>SEQ ID NO: 25 AAV9</p>	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDN ARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQL KAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKRLL EPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKR LNFQGTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGS LTMASGGGAPVADN NEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHL YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR LINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQV FTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGR NYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMN PGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNE EEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMV WQDRDVYLVQPIWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGMKHPPPQILIK NTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR WNPEIQYTSNYKSNVFEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL</p>
<p>SEQ ID NO: 26 Человеческий SLC6A1, вариант транскрипта 2 (изоформа а)</p>	<p>GCCCTCGGAAGACCGAGACAGCGGAGAGGTTGCGGGTGAGC TGCGCTGAGCCCAGGAGCCGAGGAGTCGGGAGCGCAGTAGC GCTGAGCCCGAGCCCGAGCGGCCCGCGTCCCGAGCGCATCG GAGCGGCCGAGCCCGCCCGGATGCAGCGCCTGTCCCGGGCAGC GCAGCCCCGGCCGAGGATCTCACCCAGGGTGGCAGAAGGA GGCCTTCTGGAGCTGACCCACCCCGACGACCATCAGGGTGC CCTTGAGCCGCAAACTGCTGTCCACGTGGACCGGGGGTGAC ATCGCACGTCCATCTGCCAGGACCCCTGCGTCCAAATTCCGA GACATGGCGACCAACGG CAGCAAGGTGGCCGACGGGCAGATCTCCACCGAGGTCAGCG AGGCCCTGTGGCCAATGACAAGCCCAAACCTTGGTGGTCA</p>

AGGTGCAGAAGAAGGCGGCAGACCTCCCCGACCGGGACACG
TGGAAGGGCCGCTTCGACTTCCTCATGTCCTGTGTGGGCTATG
CCATCGGCCTGGGCAACGTCTGGAGGTTCCCCTATCTCTGCG
GGAAAAATGGTGGGGGAGCCTTCCTGATCCCCTATTTCTGA
CACTCATCTTTGCGGGGGTCCCCTCTTCCTGCTGGAGTGCTC
CCTGGGCCAGTACACCTCCATCGGGGGGCTAGGGGTATGGAA
GCTGGCTCCTATGTTCAAGGGCGTGGGCCCTTGC GGCTGCTGT
GCTATCATTCTGGCTGAACATCTACTACATCGTCATCATCTCC
TGGGCCATTTACTACCTGTACAACCTTCACCACGACACTGC
CGTGGAACAGTGCGACAACCCCTGGAACACAGACCGCTGCT
TCTCCAACACTACAGCATGGTCAACACTACCAACATGACCAGCG
CTGTGGTGGAGTTCTGGGAGCGCAACATGCATCAGATGACGG
ACGGGCTGGATAAGCCAGGTCAGATCCGCTGGCCACTGGCCA
TCACGCTGGCCATCGCCTGGATCCTTGTGTATTTCTGTATCTG
GAAGGGTGTGGCTGGACTGGAAAGGTGGTCTACTTTTCAGC
CACATACCCCTACATCATGCTGATCATCCTGTTCTTCCGTGGA
GTGACGCTGCCCGGGGCCAAGGAGGGCATCCTCTTCTACATC
ACACCCAACCTCCGCAAGCTGTCTGACTCCGAGGTGTGGCTG
GATGCGGCAACCCAGATCTTCTTCTCATAACGGGCTGGGCCTG
GGTCCCTGATCGCTCTCGGGAGCTACAACCTTTCCACAAC
AATGTCTACAGGGACTCCATCATCGTCTGCTGCATCAATTCGT
GCACCAGCATGTTTCGCAGGATTCGTCATCTTCTCCATCGTGGG
CTTCATGGCCCATGTCACCAAGAGGTCCATTGCTGATGTGGC
GGCCTCAGGCCCCGGGCTGGCGTTCCTGGCATAACCAGAGGC
GGTGACCCAGCTGCCTATCTCCCCACTCTGGGCCATCCTCTTC
TTCTCCATGCTGTTGATGCTGGGCATTGACAGCCAGTTCTGCA
CTGTGGAGGGCTTCATCACAGCCCTGGTGGATGAGTACCCCA
GGCTCCTCCGCAACCGCAGAGAGCTCTTCATTGCTGCTGTCTG
CATCATCTCCTACCTGATCGGTCTCTAACATCACTCAGGGG
GGTATTTATGTCTTCAAACCTTTTACTACTACTCTGCCAGTG
GCATGAGCCTGCTGTTCTCGTGTTCTTTGAATGTGTCTCTAT
TTCCTGGTTTTACGGTGTCAACCGATTCTATGACAATATCCAA
GAGATGGTTGGATCCAGGCCCTGCATCTGGTGGAAACTCTGC
TGGTCTTTCTTACACCAATCATTGTGGCGGGCGTGTTCAATTT
TCAGTGCTGTGCAGATGACGCCACTCACCATGGGAAACTATG

TTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGTGTGGGCTGGCTGATGGCTC
TGTCTTCCATGGTCCTCATCCCCGGGTACATGGCCTACATGTT
CCTCACCTTAAAGGGCTCCCTGAAGCAGCGCATCCAAGTCAT
GGTCCAGCCCAGCGAAGACATCGTTCGCCAGAGAATGGTCC
TGAGCAGCCCCAGGCGGGCAGCTCCACCAGCAAGGAGGCCT
ACATCTAGGGTGGGGGCCACTCACCGACCCGACACTCTCACC
CCCCGACCTGGCTGAGTGCAGACCACCTTGATGTCTGAGGA
TACCTTCCATCTCAACCTACCTCGAGTGGCGAGTCCAGACAC
CATCACCACGCAGAGAGGGGAGGTGGGAGGACAGTTAGACC
CCTGGGTGGGCCCTGCCGTGGGCAAGGATAACCCGGTGGCTTC
TGGCACCTGGCGGGCTGGTGACCTTTTTAATCCAGGCCCCATC
AGCATCCCACGATCGGCCTTGGTAACCGCCGCGGTAGATCAT
TTTTATCCCGCCAGGGAGTGTGATGCAGGAAGACCACATGCG
CTCCTGGCTTTTAAACCTGTTCCCTGACTGTTCTTACTGCCG
AAACCCTTGACTGTTATCTCGGACTTTGCAGGAGTTCCTTTCC
CTCCGAACGCTGCTCCATGCACAGGAAAAGGGCATTTTGTAC
AATGGGGACTTCCCGGGAACGCTTGCTCTTAAGTACCAGAAG
CCGGCGGAGCTCTGGCTTTCGTGTTTTTGGTTTTCTCCTTCCCA
AGGCAGCTGGATTGAAAAACAAAACAAAACAAAAAACCC
AGGGGCGTCAGTCGATATTCCCAGGGCCGCTTCTCCTGCAGT
CTGTGGAGCGTCCTTGTCCCCGCCGCGGAATGAATGAGCAT
TCTGCAGCCCGATGTCCCTGTCCCCTCCTCGCCGGGCCATTCT
GATTGGACCTGGCCCAGTGCAATCTGTCCAGACAAGCCCTGC
TTGCTGGAAAACCTGCCACAAGCACAATTGATCTCTTTTTATCG
CCATTCCAGGGGCCTCAGGTCCTACTGGGGAAACTTCCTATA
CCGGAGCTCCAGTTTCTCTTAAGCTGCCCAATTTACAGAGTA
CAAAATAGTTGTAGGGGAAATCAAGGTGAAGGATCTGTCCGA
CAGTCAAGACGGATCCACAGTAATCTTTCGGTCTCCTTAAACT
ACCACCCTCGCTGCCACCCACCCAAGCTGCTGCCGCCTCAC
CTTCCTTGAAATTTCTCAGCGGGAGTCTCCTCACTGCCACTAA
AATCCACCCAGCCACTAACTGAGGAGCTAGTGT
TAATCCAGAGAACCCCCGCAATGTGCTTCCGAGATTCAGAC
TGCTTCATTGGGAAGTATGATTTGTTCCCTTTCTGGAATTGGGC
TCCGTGGTGGCGGCGGCACTTCAAGCAAAGACAGTTTCTTGC
AAGCTCCAGTAGCTCCGCGTGTCTCATTGCCAGGAAGATGG

	<p>GTTCCCACGTAGCAAATCGTACATTGTGCCCTGTAGCTCCTTA GCTAGTTAGCTCACAAGCCGTGTTTTATGACTAATCCTTAATA ACTATGGTAAATAACTGTGACTGTGGGGTTTTTAATCTCTTGT CATTCTCATCCAAAAGTGACCAGCATAACCAGTTCTTGCAATA AGATATTACCCTCAGAATATTAAGCACATTATTGTAGAGAAA AAAAAATATGTGTACACATATGAACGCACAACATGCACATTC ATCCTCACATGTGGCACGTAAGGTCTCATTTGATATTGTGTAG GAAATCTGAAGCCTTTTCCTGAGGTCATCTGTAAAATAGTCTC ATTGCCAAGGCATCCCCAGTGCCAGCTGGTGAATCCATGATC AAAATGCATACGTATTGTTAAATGATAAGGTTTAGAATGACA GGAACCCATCACTGTGTCTCATGGTCCCCTTCCCCATCTGTG TGTGAATTCCTTTAGACTAAGGGCAGGAAGACTTCCAGCTTT CTCTTTGTTCTTCAATGTGAAACTGAGACCAAGTCTCTCTAAG ACAAATGCAGTGTATTTAATGTTTGTAAGCAATTCTAAGTGA GATGTTTGGAAGAAATCCCCTAACTGATTTCCATCCAAACCT ACCTTATAGAGCACAATATTAAGTGTTGTACAATTAAGTGA GAACTGTGAATATGTGTAACCTTTTTTTTAGTATTTGCCCGGGG GGAAAAAGATATTGTATTATCATATATGCTTTTTTTGCAATAAG GATTTATTCTCAGAACACCAAGTAAATCTATCTCTATATAAAA AATATATGTAATATATAACATATTCAAAGTATATACAGAGCCT GTTTTAAAAAATACAGTATTATTTAGTAAAATTATCTGTTCTA TGGACCAAATGTAAAATATTTATAAATGAAGATGCATTTTAA ATGTCTATAAATGGTGTCACTAGAGCACGGGCGTTATGT AAGTTTCTAAGAATTTAGAGGATAAATAATAAAGGTTCTATG ATATACAA</p>
<p>SEQ ID NO: 27 Человеческий SLC6A1, вариант транскрипта 3 (изоформа b)</p>	<p>GCCCTCGGAAGACCGAGACAGCGGAGAGGTTGCGGGTGAGC TGCGCTGAGCCCAGGAGCCGAGGAGTCGGGAGCGCAGTAGC GCTGAGCCCGAGCCCGAGCGGCCCGCGTCCCGAGCGCATCG GAGCGGCCGAGCCGCCCGGATGCAGCGCCTGTCCCGGGCAGC GCAGCCCCGGCCGCAGGATCTCACCCAGGGTGGCAGAAGGA GGCCTTCTGGAGCTGACCCACCCCGACGACCATCAGGGTGC CCTTGAGCCGCAAACTGCTGTCCACGTGGACCGGGGGTGAC ATCGCACGTCCATCTGCCAGGACCCCTGCGTCCAAATTCCGA GACATGGCGACCAACGGCAGCAAGGTGGCCGACGGGCAGAT CTCCACCGAGGAGCCTTCCTGATCCCCTATTTCTGACACTCA</p>

TCTTTGCGGGGGTCCCCTCTTCCTGCTGGAGTGCTCCCTGGG
CCAGTACACCTCCATCGGGGGGCTAGGGGTATGGAAGCTGGC
TCCTATGTTCAAGGGCGTGGGCCTTGCGGCTGCTGTGCTATCA
TTCTGGCTGAACATCTACTACATCGTCATCATCTCCTGGGCCA
TTTACTACCTGTACAACCTCCTTCACCACGACACTGCCGTGGAA
ACAGTGCGACAACCCCTGGAACACAGACCGCTGCTTCTCCAA
CTACAGCATGGTCAACACTACCAACATGACCAGCGCTGTGGT
GGAGTTCTGGGAGCGCAACATGCATCAGATGACGGACGGGCT
GGATAAGCCAGGTCAGATCCGCTGGCCACTGGCCATCACGCT
GGCCATCGCCTGGATCCTTGTGTATTTCTGTATCTGGAAGGGT
GTTGGCTGGACTGGAAAGGTGGTCTACTTTTCAGCCACATAC
CCCTACATCATGCTGATCATCCTGTTCTTCCGTGGAGTGACGC
TGCCCGGGGCAAGGAGGGCATCCTCTTCTACATCACACCCA
ACTTCCGCAAGCTGTCTGACTCCGAGGTGTGGCTGGATGCGG
CAACCCAGATCTTCTTCTCATAACGGGCTGGGCCTGGGGTCCCT
GATCGCTCTCGGGAGCTACAACCTTTCCACAACAATGTCTAC
AGGGACTCCATCATCGTCTGCTGCATCAATTCGTGCACCAGC
ATGTTTCGAGGATTCGTATCTTCTCCATCGTGGGCTTCATGG
CCCATGTCACCAAGAGGTCCATTGCTGATGTGGCGGCCTCAG
GCCCCGGGCTGGCGTTCCTGGCATAACCCAGAGGCGGTGACCC
AGCTGCCTATCTCCCCACTCTGGGCCATCCTCTTCTTCTCCAT
GCTGTTGATGCTGGGCATTGACAGCCAGTTCTGCACTGTGGA
GGGCTTCATCACAGCCCTGGTGGATGAGTACCCAGGCTCCT
CCGCAACCGCAGAGAGCTCTTCATTGCTGCTGTCTGCATCATC
TCCTACCTGATCGGTCTCTTAACATCACTCAGGGGGGTATTT
ATGTCTTCAAACCTCTTTGACTACTACTCTGCCAGTGGCATGAG
CCTGCTGTTCCCTCGTGTCTTTGAATGTGTCTCTATTTCCCTGGT
TTACGGTGTCAACCGATTCTATGACAATATCCAAGAGATGG
TTGGATCCAGGCCCTGCATCTGGTGGAACTCTGCTGGTCTTT
CTTCACACCAATCATTGTGGCGGGCGTGTTCATTTTAGTGCT
GTGCAGATGACGCCACTCACCATGGGAACTATGTTTTCCC
AAGTGGGGCCAGGGTGTGGGCTGGCTGATGGCTCTGTCTTCC
ATGGTCCTCATCCCCGGGTACATGGCCTACATGTTCCCTCACCT
TAAAGGGCTCCCTGAAGCAGCGCATCCAAGTCATGGTCCAGC
CCAGCGAAGACATCGTTCGCCAGAGAATGGTCCTGAGCAGC

CCCAGGCGGGCAGCTCCACCAGCAAGGAGGCCTACATCTAGG
GTGGGGGCCACTCACCGACCCGACACTCTCACCCCCGACCT
GGCTGAGTGCGACCACCACTTGATGTCTGAGGATACCTTCC
ATCTCAACCTACCTCGAGTGGCGAGTCCAGACACCATCACCA
CGCAGAGAGGGGAGGTGGGAGGACAGTTAGACCCCTGGGTG
GGCCCTGCCGTGGGCAAGGATACCCGGTGGCTTCTGGCACCT
GGCGGGCTGGTGACCTTTTTAATCCAGGCCCCATCAGCATCC
CACGATCGGCCTTGGTAACCGCCGCGGTAGATCATTTTTATCC
CGCCAGGGAGTGTGATGCAGGAAGACCACATGCGCTCCTGGC
TTTTAAACCTGTTCCCTGACTGTTCTTACTGCCGAAACCCTT
GACTGTTATCTCGGACTTTGCAGGAGTTCCTTTCCTCCGAAC
GCTGCTCCATGCACAGGAAAAGGGCATTTTGTACAATGGGGA
CTTCCCGGGAACGCTTGCTCTTAAGTACCAGAAGCCGGCGGA
GCTCTGGCTTTCGTGTTTTTGGTTTTCTCCTTCCCAAGGCAGCT
GGATTGAAAAACAACAACAACAACAAAAAACCCAGGGGCGT
CAGTCGATATTCCCAGGGCCGCTTCTCCTGCAGTCTGTGGAGC
GTCCTTGTCCCCGCCGCCGAATGAATGAGCATTCTGCAGCC
CGATGTCCCTGTCCCCTCCTCGCCGGGCCATTCTGATTGGACC
TGGCCCAGTGCAATCTGTCCAGACAAGCCCTGCTTGCTGGAA
AACTGCCACAAGCACAATTGATCTCTTTTTATCGCCATTCCAG
GGGCCTCAGGTCCTACTGGGGAAACTTCCTATACCGGAGCTC
CAGTTTCTCTTAAGCTGCCCAATTTACAGAGTACAAAATAGT
TGTAGGGGAAATCAAGGTGAAGGATCTGTCCGACAGTCAAG
ACGGATCCACAGTAATCTTTCGGTCTCCTTAAACTACCACCCT
CGCTGCCACCCACCCCAAGCTGCTGCCGCCTCACCTTCCCTGA
AATTTCTCAGCGGGAGTCTCCTCACTGCCACTAAAATCCACCC
AGCCCACTAACTGAGGAGCTAGTGTTAATCCAGAGAACCCCC
CGCAATGTGCTTCCGAGATTCAGACTGCTTCATTGGGAAGTA
TGATTTGTTCTTTCTGGAATTGGGCTCCGTGGTGGCGGCGGC
ACTTCAAGCAAAGACAGTTTCTTGCAAGCTCCAGTAGCTCCG
CGTGTCTCATTTGCCAGGAAGATGGGTTCACGTAGCAAAT
CGTACATTGTGCCCTGTAGCTCCTTAGCTAGTTAGCTCACAAG
CCGTGTTTTATGACTAATCCTTAATAACTATGGTAAATAACTG
TGACTGTGGGGTTTTTAATCTCTTGTCATTCTCATCCAAAAGT
GACCAGCATAACCAGTTCTTGCAATAAGATATTACCCTCAGAA

	<p>TATTAAGCACATTATTGTAGAGAAAAAAAAAATATGTGTACAC ATATGAACGCACAACATGCACATTCATCCTCACATGTGGCAC GTAAGGTCTCATTGATATTGTGTAGGAAATCTGAAGCCTTTT CCTGAGGTCATCTGTAAAATAGTCTCATTGCCAAGGCATCCC CAGTGCCAGCTGGTGAATCCATGATCAAAATGCATACGTATT GTTAAATGATAAGGTTTAGAATGACAGGAACCCATCACTGTG TCTCATGGTCCCCTTCCCCATCTGTGTGTGAATTCCTTTAGA CTAAGGGCAGGAAGACTTCCAGCTTTC TCTTTGTTCTTCAATGTGAACTGAGACCAAGTCTCTCTAAGA CAAATGCAGTGTATTTAATGTTTGTAAGCAATTCTAAGTGAG ATGTTTGGCAAGAAATCCCCTAACTGATTTCCATCCAAACCTA CCTTATAGAGCACAATATTAAGTGTTGTACAATTACTGTGAG AACTGTGAATATGTGTAACCTTTTTTTTAGTATTTGCCCGGGGG GAAAAAGATATTGTATTATCATATATGCTTTTTTTGCAATAAGG ATTTATTCTCAGAACACCAAGTAAATCTATCTCTATATAAAAA ATATATGTAATATATACATATTCAAAGTATATACAGAGCCTG TTTTAAAAAATACAGTATTATTTAGTAAAATTATCTGTTCTAT GGACCAAATGTAAAATATTTATAAATGAAGATGCATTTTAAA TGCTATAAATGGTGTCACTAGAGCACGGGGCGTTATGTA AGTTTCTAAGAATTTAGAGGATAAATAATAAAGGTTCTATGA TATACAA</p>
<p>SEQ ID NO: 28 Человеческий SLC6A1, вариант транскрипта 4 (изоформа с)</p>	<p>GCCCTCGGAAGACCGAGACAGCGGAGAGGTTGCGGGTGAGC TGCGCTGAGCCCAGGAGCCGAGGAGTCGGGAGCGCAGTAGC GCTGAGCCCGAGCCCGAGCGGCCCGCGTCCCGAGCGCATCG GAGCGGCCGAGCCGCCCGGATGCAGCGCCTGTCCCGGGCAGC GCAGCCCCGCGCCGAGGATCTCACCCAGGGTGGCAGAAGGA GGCCTTCTGGAGCTGACCCACCCCCGACGACCATCAGGGTGA GGCAACTCCAAGGTCCTACTCTCTTTCTGTGCCTGTTACCCAC CCCGTCCTCCTAGGGTGCCCTTGAGCCGCAAACTGCTGTCC ACGTGGACCGGGGGTG ACATCGCACGTCCATCTGCCAGGACCCCTGCGTCCAAATTCC GAGACATGGCGACCAACGGCAGCAAGGTGGCCGACGGGCAG ATCTCCACCGAGGCGTGGGCCTTGCGGCTGCTGTGCTATCATT CTGGCTGAACATCTACTACATCGTCATCATCTCCTGGGCCATT TACTACCTGTACAACCTCCTCACCACGACACTGCCGTGGAAA</p>

CAGTGCGACAACCCCTGGAACACAGACCGCTGCTTCTCCAAC
TACAGCATGGTCAACACTACCAACATGACCAGCGCTGTGGTG
GAGTTCTGGGAGCGCAACATGCATCAGATGACGGACGGGCTG
GATAAGCCAGGTCAGATCCGCTGGCCACTGGCCATCACGCTG
GCCATCGCCTGGATCCTTGTGTATTTCTGTATCTGGAAGGGTG
TTGGCTGGACTGGAAAGGTGGTCTACTTTTCAGCCACATAACC
CCTACATCATGCTGATCATCCTGTTCTTCCGTGGAGTGACGCT
GCCCCGGGGCCAAGGAGGGCATCCTCTTCTACATCACACCCAA
CTTCCGCAAGCTGTCTGACTCCGAGGTGTGGCTGGATGCGGC
AACCCAGATCTTCTTCTACATACGGGCTGGGCCTGGGGTCCCTG
ATCGCTCTCGGGAGCTACAACCTTTCCACAACAATGTCTACA
GGGACTCCATCATCGTCTGCTGCATCAATTCGTGCACCAGCAT
GTTTCGCAGGATTCGTCATCTTCTCCATCGTGGGCTTCATGGCC
CATGTCACCAAGAGGTCCATTGCTGATGTGGCGGCCTCAGGC
CCCGGGCTGGCGTTCCTGGCATAACCAGAGGCGGTGACCCAG
CTGCCTATCTCCCCACTCTGGGCCATCCTCTTCTTCTCCATGCT
GTTGATGCTGGGCATTGACAGCCAGTTCTGCACTGTGGAGGG
CTTCATCACAGCCCTGGTGGATGAGTACCCAGGCTCCTCCG
CAACCGCAGAGAGCTCTTCATTGCTGCTGTCTGCATCATCTCC
TACCTGATCGGTCTCTCTAACATCACTCAGGGGGGTATTTATG
TCTTCAAACCTCTTTGACTACTACTCTGCCAGTGGCATGAGCCT
GCTGTTCCCTCGTGTCTTTGAATGTGTCTCTATTTCCCTGGTTTT
ACGGTGTCAACCGATTCTATGACAATATCCAAGAGATGGTTG
GATCCAGGCCCTGCATCTGGTGGAAACTCTGCTGGTCTTTCTT
CACACCAATCATTGTGGCGGGCGTGTT
CATTTTCAGTGCTGTGCAGATGACGCCACTCACCATGGGAAA
CTATGTTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGTGTGGGCTGGCTGAT
GGCTCTGTCTTCCATGGTCCTCATCCCCGGGTACATGGCCTAC
ATGTTCCCTCACCTTAAAGGGCTCCCTGAAGCAGCGCATCCAA
GTCATGGTCCAGCCCAGCGAAGACATCGTTCGCCCAGAGAAT
GGTCCTGAGCAGCCCCAGGCGGGCAGCTCCACCAGCAAGGA
GGCCTACATCTAGGGTGGGGGCCACTCACCGACCCGACACTC
TCACCCCCCGACCTGGCTGAGTGCGACCACCACTTGATGTCT
GAGGATACCTTCCATCTCAACCTACCTCGAGTGGCGAGTCCA
GACACCATCACACGCAGAGAGGGGAGGTGGGAGGACAGTT

AGACCCCTGGGTGGGCCCTGCCGTGGGCAAGGATACCCGGTG
GCTTCTGGCACCTGGCGGGCTGGTGACCTTTTTAATCCAGGCC
CCATCAGCATCCCACGATCGGCCTTGGTAACCGCCGCGGTAG
ATCATTTTTATCCCGCCAGGGAGTGTGATGCAGGAAGACCAC
ATGCGCTCCTGGCTTTTAAACCTGTTCCCTGACTGTTCTCTTACT
GCCGAAACCCTTGACTGTTATCTCGGACTTTGCAGGAGTTCCT
TTCCCTCCGAACGCTGCTCCATGCACAGGAAAAGGGCATT
GTACAATGGGGACTTCCCGGGAACGCTTGCTCTTAAGTACCA
GAAGCCGGCGGAGCTCTGGCTTTCGTGTTTTTGGTTTTCTCCT
TCCCAAGGCAGCTGGATTGAAAAACAAAACAAAACAAAA
AACCCAGGGGCGTCAGTCGATATTCCAGGGCCGCTTCTCCT
GCAGTCTGTGGAGCGTCCTTGTCGCCCGCCGCGGAATGAATG
AGCATTCTGCAGCCCGATGTCCCTGTCCCCTCCTCGCCGGGCC
ATTCTGATTGGACCTGGCCCAGTGCAATCTGTCCAGACAAGC
CCTGCTTGCTGGAAAACCTGCCACAAGCACAATTGATCTCTTTT
TATCGCCATTCCAGGGGCCTCAGGTCCTACTGGGGAACTTC
CTATAACCGGAGCTCCAGTTTCTCTTAAGCTGCCCAATTCACA
GAGTACAAAATAGTTGTAGGGGAAATCAAGGTGAAGGATCT
GTCCGACAGTCAAGACGGATCCACAGTAATCTTTCGGTCTCC
TTAAACTACCACCCTCGCTGCCACCCACCCCAAGCTGCTGCC
GCCTCACCTTCCTTGAAATTTCTCAGCGGGAGTCTCCTCACTG
CCACTAAAATCCACCCAGCCACTAACTGAGGAGCTAGTGTT
AATCCAGAGAACCCCCGCAATGTGCTTCCGAGATTCAGACT
GCTTCATTGGGAAGTATGATTTGTTCCCTTTCTGGAATTGGGCT
CCGTGGTGGCGGCGGCACTTCAAGCAAAGACAGTTTCTTGCA
AGCTCCAGTAGCTCCGCGTGTCTCATTGTCAGGAAGATGGG
TTCCACGTAGCAAATCGTACATTGTGCCCTGTAGCTCCTTAG
CTAGTTAGCTCACAAGCCGTGTTTTATGACTAATCCTTAATAA
CTATGGTAAATAACTGTGACTGTGGGGTTTTTAATCTCTTGTC
ATTCTCATCCAAAAGTGACCAGCATAACCAGTTCTTGCAATAA
GATATTACCCTCAGAATATTAAGCACATTATTGTAGAGAAAA
AAAAATATGTGTACACATATGAACGCACAACATGCACATTCA
TCCTCACATGTGGCACGTAAGGTCTCATTGATATTGTGTAGG
AAATCTGAAGCCTTTTCCTGAGGTCATCTGTAAAATAGTCTCA
TTGCCAAGGCATCCCCAGTGCCAGCTGGTGAATCCATGATCA

	AAATGCATACGTATTGTTAAATGATAAGGTTTAGAATGACAG GAACCCATCACTGTGTCTCATGGTCCCCTTCCCCATCTGTGT GTGAATTCCTTTAGACTAAGGGCAGGAAGACTTCCAGCTTTC TCTTTGTTCTTCAATGTGAACTGAGACCAAGTCTCTCTAAGA CAAATGCAGTGTATTTAATGTTTGTAAG CAATTCTAAGTGAGATGTTTGGCAAGAAATCCCCTAACTGAT TTCCATCCAAACCTACCTTATAGAGCACAATATTAAGTGTTGT ACAATTACTGTGAGAAGTGTGAATATGTGTAAGTCTTTTTTTAG TATTTGCCCGGGGGGAAAAAGATATTGTATTATCATATATGC TTTTTTGCAATAAGGATTTATTCTCAGAACACCAAGTAAATCT ATCTCTATATAAAAAATATATGTAATATATACATATTCAAAGT ATATACAGAGCCTGTTTTAAAAAATACAGTATTATTTAGTAA AATTATCTGTTCTATGGACCAAATGTAAAATATTTATAAATGA AGATGCATTTTAAATGTCTATAAATGGTGTCATAACTAGAGC ACGGGCGTTATGTAAGTTTCTAAGAATTTAGAGGATAAATAA TAAAGGTTCTATGATATACAA
SEQ ID NO: 29 Человеческий SLC6A1, вариант транскрипта 5 (изоформа с)	GCCCTCGGAAGACCGAGACAGCGGAGAGGTTGCGGGTGAGC TGCGCTGAGCCCAGGAGCCGAGGAGTCGGGAGCGCAGTAGC GCTGAGCCCGAGCCCGAGCGGCCCGCGTCCCGAGCGCATCG GAGCGGCCGAGCCGCCC GGATGCAGCGCCTGTCCCGGGCAGC GCAGCCCCGGCCGAGGATCTCACCCAGGGTGGCAGAAGGA GGCCTTCTGGAGCTGACCCACCCCGACGACCATCAGGGTGC CCTTGAGCCGCAAACTGCTGTCCACGTGGACCGGGGGTGAC ATCGCACGTCCATCTGCCAGGACCCCTGCGTCCAAATTCCGA GACATGGCGACCAACGG CAGCAAGGTGGCCGACGGGCAGATCTCCACCGAGGCGTGGG CCTTGCGGCTGCTGTGCTATCATTCTGGCTGAACATCTACTAC ATCGTCATCATCTCCTGGGCCATTTACTACCTGTACAACCTCCT TCACCACGACACTGCCGTGGAAACAGTGCGACAACCCCTGGA ACACAGACCGCTGCTTCTCCAACCTACAGCATGGTCAACACTA CCAACATGACCAGCGCTGTGGTGGAGTTCTGGGAGCGCAACA TGCATCAGATGACGGACGGGCTGGATAAGCCAGGTCAGATCC GCTGGCCACTGGCCATCACGCTGGCCATCGCCTGGATCCTTGT GTATTTCTGTATCTGGAAGGGTGTGGCTGGACTGGAAAGGT GGTCTACTTTTCAGCCACATACCCCTACATCATGCTGATCATC

CTGTTCTTCCGTGGAGTGACGCTGCCCGGGGCCAAGGAGGGC
ATCCTCTTCTACATCACACCCA ACTTCCGCAAGCTGTCTGACT
CCGAGGTGTGGCTGGATGCGGCAACCCAGATCTTCTTCTCAT
ACGGGCTGGGCCTGGGGTCCCTGATCGCTCTCGGGAGCTACA
ACTCTTTCCACAACAATGTCTACAGGGACTCCATCATCGTCTG
CTGCATCAATTCGTGCACCAGCATGTTTCGCAGGATTCGTCATC
TTCTCCATCGTGGGCTTCATGGCCCATGTCACCAAGAGGTCCA
TTGCTGATGTGGCGGCCTCAGGCCCCGGGCTGGCGTTCCTGG
CATACCCAGAGGCGGTGACCCAGCTGCCTATCTCCCCACTCT
GGGCCATCCTCTTCTTCTCCATGCTGTTGATGCTGGGCATTGA
CAGCCAGTTCTGCACTGTGGAGGGCTTCATCACAGCCCTGGT
GGATGAGTACCCCAAGGCTCCTCCGCAACCGCAGAGAGCTCTT
CATTGCTGCTGTCTGCATCATCTCCTACCTGATCGGTCTCTCT
AACATCACTCAGGGGGGTATTTATGTCTTCAA ACTCTTTGACT
ACTACTCTGCCAGTGGCATGAGCCTGCTGTTCCCTCGTGTTCTT
TGAATGTGTCTCTATTTCCCTGGTTTTACGGTGTCAACCGATTC
TATGACAATATCCAAGAGATGGTTGGATCCAGGCCCTGCATC
TGGTGAAACTCTGCTGGTCTTTCTTCACACCAATCATTGTGG
CGGGCGTGTTCA TTTTCAGTGCTGTGCAGATGACGCCACTCAC
CATGGGAAACTATGTTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGTGTGGG
CTGGCTGATGGCTCTGTCTTCCATGGTCCTCATCCCCGGGTAC
ATGGCCTACATGTTCCCTCACCTTAAAGGGCTCCCTGAAGCAG
CGCATCCAAGTCATGGTCCAGCCCAGCGAAGACATCGTTTCGC
CCAGAGAATGGTCCTGAGCAGCCCCAGGCGGGCAGCTCCACC
AGCAAGGAGGCCTACATCTAGGGTGGGGGCCACTCACCGACC
CGACACTCTCACCCCCGACCTGGCTGAGTGCGACCACCACT
TGATGTCTGAGGATACCTTCCATCTCAACCTACCTCGAGTGGC
GAGTCCAGACACCATCACACGCAGAGAGGGGAGGTGGGAG
GACAGTTAGACCCTGGGTGGGCCCTGCCGTGGGCAAGGATA
CCCGGTGGCTTCTGGCACCTGGCGGGCTGGTGACCTTTTTAAT
CCAGGCCCCATCAGCATCCCACGATCGGCCTTGGTAACCGCC
GCGGTAGATCATTTTTATCCCGCCAGGGAGTGTGATGCAGGA
AGACCACATGCGCTCCTGGCTTTTTAAACCTGTTCCCTGACTGTT
CTCTTACTGCCGAAACCCTTGACTGTTATCTCGGACTTTGCAG
GAGTTCCTTTCCCTCCGAACGCTGCTCCATGCACAGGAAAAG

GGCATTTTGTACAATGGGGACTTCCCGGGAACGCTTGCTCTTA
AGTACCAGA
AGCCGGCGGAGCTCTGGCTTTCGTGTTTTTGGTTTTCTCCTTC
CCAAGGCAGCTGGATTGAAAAACAAAACAAAAA
CCCAGGGGCGTCAGTCGATATTCCCAGGGCCGCTTCTCCTGC
AGTCTGTGGAGCGTCCTTGTCCCCGCCGCGGAATGAATGAG
CATTCTGCAGCCCGATGTCCCTGTCCCTCCTCGCCGGGCCAT
TCTGATTGGACCTGGCCCAGTGCAATCTGTCCAGACAAGCCC
TGCTTGCTGGAAACTGCCACAAGCACAATTGATCTCTTTTA
TCGCCATTCCAGGGGCCTCAGGTCCTACTGGGGAAACTTCCT
ATACCGGAGCTCCAGTTTCTCTTAAGCTGCCCAATTCACAGA
GTACAAAATAGTTGTAGGGGAAATCAAGGTGAAGGATCTGTC
CGACAGTCAAGACGGATCCACAGTAATCTTTCGGTCTCCTTA
AACTACCACCCTCGCTGCCACCCACCCAAGCTGCTGCCGCC
TCACCTTCCTTGAAATTTCTCAGCGGGAGTCTCCTCACTGCCA
CTAAAATCCACCCAGCCCCTAACTGAGGAGCTAGTGTTAAT
CCAGAGAACCCCCGCAATGTGCTTCCGAGATTCAGACTGCT
TCATTGGGAAGTATGATTTGTTCTTTCTGGAATTGGGCTCCG
TGGTGGCGGCGGCACTTCAAGCAAAGACAGTTTCTTGCAAGC
TCCAGTAGCTCCGCGTGTCTCATTTGCCAGGAAGATGGGTTC
CACGTAGCAAATCGTACATTGTGCCCTGTAGCTCCTTAGCTAG
TTAGCTCACAAGCCGTGTTTTATGACTAATCCTTAATAACTAT
GGTAAATAACTGTGACTGTGGGGTTTTTAATCTCTTGTCATTC
TCATCCAAAAGTGACCAGCATAACCAGTTCTTGCAATAAGATA
TTACCCTCAGAATATTAAGCACATTATTGTAGAGAAAAAAA
ATATGTGTACACATATGAACGCACAACATGCACATTCATCCT
CACATGTGGCACGTAAGGTCTCATTTGATATTGTGTAGGAAA
TCTGAAGCCTTTTCCTGAGGTCATCTGTAAAATAGTCTCATTG
CCAAGGCATCCCAGTGCCAGCTGGTGAATCCATGATCAAAA
TGCATACGTATTGTTAAATGATAAGGTTTAGAATGACAGGAA
CCCATCACTGTGTCTCATGGTCCCCTTCCCATCTGTGTGTG
AATTCCTTTAGACTAAGGGCAGGAAGACTTCCAGCTTTCTCTT
TGTTCTTCAATGTGAAACTGAGACCAAGTCTCTCTAAGACAA
ATGCAGTGTATTTAATGTTTGTAAGCAATTCTAAGTGAGATGT
TTGGCAAGAAATCCCCTAACTGATTTCCATCCAAACCTACCTT

	<p>ATAGAGCACAATATTAAGTGTTGTACAATTACTGTGAGA ACTGTGAATATGTGTAACCTTTTTTTTAGTATTTGCCCGGGGGGAAA AAGATATTGTATTATCATATATGCTTTTTTTGCAATAAGGATTT ATTCTCAGAACACCAAGTAAATCTATCTCTATATAAAAAATA TATGTAATATATACATATTCAAAGTATATACAGAGCCTGTTTT AAAAAATACAGTATTATTTAGTAAAATTATCTGTTCTATGGAC CAAATGTAAAATATTTATAAATGAAGATGCATTTTAAATGTC TATAAATGGTGTCTATAACTAGAGCACGGGCGTTATGTAAGTT TCTAAGAATTTAGAGGATAAATAATAAAGGTTCTATGATATA CAA</p>
<p>SEQ ID NO: 30 Последовательность ДНК AAV природного типа</p>	<p>TTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGA GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG GGGTCAGTGTACAACCAATTAACCAATTCTGAACATTATCG CGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTT TGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGC CGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGG GGACTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATA AAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGCCCGGGC TAATTAGGGGGTGTGCGCCCTTCGCTGAAGTCCTGTATTAGAG GTCACGTGAGTGTGTTTTCGCGACATTTTTCGCGACACCATGTGGTCA CGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATT TTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTT TTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCA TCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGA GAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAA TCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCA GCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCC GGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTA CTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACCACCGGGGTGAAATC CATGGTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCGCGAAAACT GATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAAA CTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCG GGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGC TCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATA TGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTA</p>

AACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGC
AGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCG
CCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTG
GTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCA
GTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGC
GGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAA
TGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTA
CCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCG
GATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATA
TGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAGTTCGG
CAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGG
GAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTT
CTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCTTCAA
CGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGA
AGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAGCCATTCTCG
GAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCG
GCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACC
AACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAA
CACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTC
ACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAG
GAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTT
GAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAA
GAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCA
AACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACG
CGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAAT
GTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAG
ACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTAC
TCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTGAGA
ATCTCAACCCGTTTCTGTGTCGTA AAAAGGCGTATCAGAACT
GTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTG
CACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATC
TTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGG
TTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATA
AGACAGTGGTGGAAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACAAA
GCCCCGAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCT

TCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAA
GGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGC
ACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAAC
CCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAG
CGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGA
GCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGGATCCTTGAACCTCTGGGC
CTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAG
GCCGGTAGAGCACTCTCCTGCCGAGCCAGACTCCTCCTCGGG
AACCGGAAAGAGCGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGA
ATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCC
AGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAA
CTAATACGATGGCTAGCGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACA
ATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATT
GGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATACCA
CCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACC
TCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACA
ATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTT
CAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAAAG
ACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGACCCAAGAGACTCAG
CTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGAA
TGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGT
TCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCTC
GGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCCAGCAGAC
GTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAAC
GGGAGTCAGGCAGTAGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAG
TACTTTCCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTACCT
TCAGCTACACTTTTGAGGACGTTCCTTTCCACAGCAGCTACGC
TCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGA
CCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACACTCCAAGTGG
AACCACCACGATGTCAAGGCTTCAGTTTTTCTCAGGCCGGAGC
GAGTGACATTTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGACC
CTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACAGCCGCGGATAA
CAACAACAGTGACTACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA
CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGGCCAT
GGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTACTTTCCTCAGA

GCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGACTCAGGCAAACAA
ATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAA
ATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCT
GTATCTACCAACCTCCAGAGCGGCAACACCCAAGCAGCTACC
AGCGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGG
CAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAAG
ATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGG
GTGGATTCCGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAA
GAACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGC
GGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACA
GGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACA
GCAAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCA ACTACA
ACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCG
TGTATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTC
GTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGT
TTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGCGTCAAAAGGGCGACACA
AAATTTATTCTAAATGCATAATAAATACTGATAACATCTTATA
GTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTTTC
TAGAGCGGCCGCAGATCTCAGCTGGATATCAAAA ACTGATTT
TCCCTTTATTATTTTCGAGATTTATTTTCTTAATTCTCTTTAAC
AACTAGAAATATTGTATATACAAAAATCATAAATAATAGA
TGAATAGTTTAATTATAGGTGTTCAATCGAAAAAGCAAC
GTATCTTATTTAAAGTGCGTTGCTTTTTTCTCATTATAAGGTT
AAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAA
ATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATAAAAA
AACCCGCCGAAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGA
TTACTCGTTATCAGAACCGCCCAGGGGGCCCGAGCTTAAGAC
TGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGCA
AAAAGGCCATCCGTCAGGGGCCTTCTGCTTAGTTTGATGCCT
GGCAGTTCCTACTCTCGCCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACT
CGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTC
ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGT

CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
CCCCGTTACAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT
CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAA
ACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCA
GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGACGCGCG
CGTAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTC
CCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCTTTTAGAAAACTCATC
GAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATC
AATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGA
AAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTA
TCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATT
AATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCA
CCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTA
TGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCT
CGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCCG
TGATTGCGCCTGAGCGAGGGCGAAATACGCGATCGCTGTAAA
AGGACAATTACAAACAGGAATCGAGTGCAACCCGGCGCAGGA
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGAT
ATTCTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGT
GGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTT
GATGGTCGGAAGTGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCT
GACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCA
TGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAAG
CGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCC
CATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATC
GCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTCTTCT

	Т
SEQ ID NO: 31 Мышиный SLC6A1, эталонная последовательност ь NCBI NM_178703.4	ATGGCGACTGACAACAGCAAGGTGGCTGATGGGCAGATCTCT ACTGAGGTCAGCGAGGCCCTGTGGCCAGCGACAAGCCCAA AACCTGGTAGTCAAGGTGCAGAAGAAGGCCGGGGACCTCC CTGACCGGGACACATGGAAGGGACGCTTCGACTTCCTCATGT CCTGCGTGGGCTATGCCATCGGCCTGGGCAATGTGTGGAGGT TCCCTTACCTCTGTGGGAAAAACGGTGGCGGGGCCTTCCTAA TCCCATATTCCTGACGCTCATCTTTGCGGGTGTTCCTCTCTTC CTTTTGGAGTGCTCCCTAGGCCAGTACACCTCCATTGGGGGCC TGGGCGTATGGAAGCTGGCGCCCATGTTCAAGGGTGTGGGCC TCGCGGCAGCTGTGCTGTCCTTCTGGCTGAACATCTACTACAT CGTCATCATCTCCTGGGCCATCTACTACCTGTACAACCTCCTTC ACCACGACCCTGCCATGGAAACAGTGTGACAACCCGTGGAAC ACTGACCGCTGCTTCTCCAACACTACAGCCTGGTCAATACCACC AACATGACCAGCGCCGTGGTGGAGTTCTGGGAGCGCAACATG CACCAGATGACAGATGGACTGGACAAGCCAGGACAGATCCG CTGGCCTCTGGCCATCACACTGGCCATTGCCTGGGTGCTCGTG TATTTCTGCATCTGGAAGGGTGTGGTTGGACTGGAAAGGTG GTCTACTTCTCAGCCACGTACCCCTACATCATGCTTATCATCC TGTTCTTCCGTGGAGTGACGCTTCCCGGGGCAAGGAGGGGA TCCTCTTCTACATCACACCCAACCTCCGAAAGCTGTCTGATTC TGAGGTGTGGCTTGACGCCGCCACCCAGATCTTCTTCTCCTAC GGGCTGGGCCTGGGGTCCCTGATTGCTCTGGGAAGCTACAAC TCTTTCCACAACAATGTGTACAGGGACTCCATCATCGTTTGCT GCATCAACTCCTGCACCAGCATGTTTGCCGGATTTCGTCATCTT CTCATCGTGGGCTTCATGGCTCATGTCACCAAGAGGTCCAT AGCTGATGTGGCAGCCTCAGGCCCGGGGCTGGCATTCTTGGC GTACCCTGAGGCTGTGACACAGCTACCCATCTCTCCCCTCTGG GCTATCCTCTTCTTCTCCATGCTGCTGATGCTGGGCATTGACA GCCAGTTCTGTACCGTGGAGGGCTTCATCACTGCCCTGGTGG ACGAGTACCCAGACTTCTCCGCAATCGCCGTGAACTCTTCAT TGCTGCCGTGTGCATCGTGTCTACCTGATTGGCCTGTCTAAC ATCACCAGGGTGGCATTATGTCTTCAAACCTGTTTGATTATT ACTCTGCCAGCGGCATGAGCTTGCTGTTCCCTGGTTTTCTTCGA GTGTGTCTCCATTCCTGGTTTTATGGTGTCAACCGGTTCTAT

	GACAACATCCAGGAGATGGTTGGCTCCAGGCCCTGCATCTGG TGGAAGCTGTGCTGGTCCTTTTTTCACACCCATCATTGTGGCGG GCGTGTTTCTCTTCAGTGCTGTGCAGATGACACCACTCACCAT GGGAAGCTATGTTTTCCCAAGTGGGGCCAGGGCGTGGGCTG GTCATGGCTCTGTCTCCATGGTGCTCATCCCCGGGTACATG GCTTACATGTTCCCTCACCTGAAGGGCTCCCTGAAGCAGCGT CTCCAGGTCATGATTCAGCCCAGTGAAGATATTGTGCGCCCT GAGAATGGCCCTGAGCAGCCGCAGGCTGGCAGCTCAGCCAG CAAGGAGGCCTACATCTAG
SEQ ID NO: 32 Мус-метка	GAGCAGAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
SEQ ID NO: 33 НА-метка	TACCCTTACGATGTACCGGATTACGCA
SEQ ID NO: 34 Интрон МЕСР2	GCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTC CGGAAATTGGCCGCCGCTGCCGCCACCGCCGCCGCCGCC GCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGAGGAGAGAC TGTGAGTGGGACCGCCAAGGCCGCGGGCGGGGACCCTTGCTG GGGGGCGGGTAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGGGGCCCGC GGGGTCGGGCGACACGGCTGGCGGTTGGCGTCCCTCCTCTCT ACCCTCCCCCTCCCTCTGCCGCCGGTGGTGGCTTTCTCCACTC GTCTCCCGCAATCGCGAGCGACGGTTCTCAGCGCGATCTCCC TGGAGCCACCTTCGATTGACGCCCTCCCGCTGCCCGCCCCATC TGTGCGCATCCTAGGCCCCAGCTGTGCAAGCGCCCTTGTCGTC TGGGCTTCGCCAGTTGGGGCTGCGCGCGCTCCTGCCCTTCTTG GGGCTTTGGGCCTCGGCACTGTGCGCGCGCCCGCGGTCCCGGC CTCTCCCTGGATCGCGCTGTCCCCTTCTCCCTCGCGCGCCCC ACTCCCGTTACTTGCTCCCCCTCACACACACAGACTGGCGCG CGTGCGCAGTCCATCTCCCGTTGGGAGAGTGCGCCACAAGGG CTCCTGAGCTCTTACCCCCATCTCTGGGTTTTGCTCCCTCCTCC TCCTCTCCCATTCCGTGACTTTTTGCCCCACTGCAAGCGAGT CGGTCCATCAGCTCCATTCCCCACTTGGCAGGAACAAGTTGA GGGTATTGTCCACCCACAAAAGGACTAGACATTTTGTTCTCCT AGGTCCCACAACCTCATCATAAAGAGTTGGTTGTAGTTCTCATC AGGAACCGTGGGCAAGGGACTGTGCGTTCCTCAGCACTCGAA GCTCTCCGTGAGACCTTGCCCGCAGGGTGCTCTGGTTCTTTG

	GGGTTGCTGTGCTGTGGCTTCGGAATTTGAGCGTCTTCCCACC CTCCCTCCCCTCCCTTCGCCAGCGTTCTGTCTACAAGAAAGAA TAGGCAGGTGTCCTTGGATATCGTAGTTGCTAATCGCCTATAC ACTGTTCTATTACACCTTTCTGCTAAGGATAGGGTTTTTGGTT TTGGTTTTGGTTTTTGTTCCCCACCCTCCAGTTTGGTTTAGTTTT GGTTTTGGCATTAGGGTTTTTTGGGGGGGAGTAATATCTTGT GGTAAAGACCCATCTGACCCAAGATACCTTTTTTCTCATACTG GAACCCTAGGCAGCAGTTGCTATTTCCCTGAGTTAGCAATAG TTTTACAGTATTTTGGAGGCCTTTTGTCCATAATTCTCACGGAA TCCCTCAGGGATCAGATTAGCTGCTGTTGGGATCAGGAAATT GGGTTACACCGCTGAAATCTCTTGCTGGGGCCCTTGTTTTGAA TTGGAAAGTCAGGAGGCTGGAACGAAGGCTCACAAGTTAAC AGTGCCAGCTGCTCTTCCAGAAGCCCTGGATTCAGTCCCACC AATCCATCGCGGGTCACAACCATCTGTAACCTCAGTCCCAAG GGGTCCGAAGCCCTCTTCTGGCTTTGCCCTATTATTTTATTTAT CTTATCTGTTTTTGTCTTGTCTGCAAGCCAGGGGGCCA TTGGGTGCAACTTATAAACTGACTTCTGTATCTTAAGAAGCCA ACCATACAGTGCTTACATTCCAGAAAAAAATCTGCCACTTT AACAGCACTAGAACTAGGGTTTAGAGAAGTATCATAAAGGTC AAATATCTTTGACCAATATCACCAGCAACCTAAAGCTGTAA GAAATCTTTGGGCCCCAGCTTGACCCAAGGATACAGTATCCT AGGGAAGTTACCAAATCAGAGATAGTATGCAGCAGCCAGG GGTCTCATGTGTGGCACTCAAGCTCACCTATACTCACTACTGT GCAGACAGCTGTGTTCTCTGTAATACTTACATATTTGTTTAA ACTTCAGGGAGGAAAAGTCAGAAGACCAGGATCTCCAGGGC CTCA
SEQ ID NO: 35, промотор EF1a	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATG TCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC CGTATATAAGTGCCTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA CGGGTTTGCCGCCAGAACACAG

Настоящее изобретение будет более подробно описано в Примерах со ссылками на варианты, проиллюстрированные на чертежах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Создание конструкции, ее продуцирование и клонирование

Плазмиды, используемые в этом исследовании, были сконструированы методами рекомбинантных ДНК. Цис-каркасные плазмиды AAV были синтезированы de-novo и содержали два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, кластер резистентности к канамицину, прокариотический ориджин репликации и последовательность полиаденилирования SV40. Последовательности ДНК SLC6A1 человека и мыши (содержащие SEQ ID NO: 15 и 31 (или 16), соответственно), кодирующие изоформу A GAT-1, были синтезированы de-novo с подходящими рестрикционными сайтами для клонирования). Отдельные промоторы были синтезированы de novo с подходящими рестрикционными сайтами. Метки гемагглютинина вируса гриппа человека (HA) или Мус (кодируемые в соответствии с SEQ ID NO: 33 и 32, соответственно) были синтезированы в виде олигонуклеотидов компанией Integrated DNA Technologies™ (Coralville, IA, USA) и встроены в amino- или карбокси-конец, как показано на фигуре 3. Четыре различных промотора были протестированы как для человеческого, так и для мышинового гена SLC6A1.

Пример 2: Оценка экспрессии SLC6A1 под контролем различных промоторов

Культура клеток

Линии клеток AD-HEK293 человека (Agilent Technologies™, Santa Clara, CA, USA) и мышинных клеток Neuro-2A (ATCC™, Manassas, VA) пассировали в DMEM+10% FBS+1% % пенициллина/стрептомицина (все от Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA). Клетки Neuro-2A дифференцировали путем добавления в среду для культивирования 10 мкМ ретиноевой кислоты (MilliporeSigma™, Burlington, MA, USA) в течение 72 часов как описано ранее (Tremblay, R. G. et al. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. J Neurosci Methods 186, 60-67, doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004 (2010)). Клетки трансфицировали с использованием липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) в соответствии с протоколом производителя. Также была включена контрольная трансфекция без плазмиды.

Иммунофлуоресценция и микроскопия

Эксперименты по визуализации проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Observer 7 (Carl Zeiss AG™, Oberkochen, Germany), оснащенный 20-кратным объективом, и монохромной камерой с быстрым охлаждением Hamamatsu Orca 4 (Hamamatsu Photonics KK™, Hamamatsu City, Japan). Трансфицированные клетки AD-HEK293 и Neuro-2A фиксировали 4% параформальдегидом (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19440) и окрашивали первыми кроличьими моноклональными антителами против GAT-1 (Abcam™, Cambridge, MA, USA) в соотношении 1:100 или кроличьими поликлональными антителами против GAT-1 (Cell Signalling Technology™, Danvers, MA, USA) в соотношении 1:100. Затем клетки окрашивали козьими антикроличьими вторыми антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 или 568, в соотношении 1:1000 перед визуализацией.

Как показано на фигуре 4, все трансфицированные клетки продемонстрировали высокий уровень экспрессии мышинового и человеческого трансгена под контролем повсеместно встречающихся промоторов EF1a, PGK, UBC и CAG. Самый высокий уровень экспрессии наблюдался в случае промотора CAG, а более низкий уровень экспрессии наблюдался, как и ожидалось, в случае промотора PGK.

Также были проанализированы клетки Neuro-2A, трансфицированные плазмидами mSLC6A1 под контролем различных нейрон-специфических промоторов и повсеместно встречающихся промоторов CAG. Как показано на фигуре 5, все промоторы давали экспрессию мышинового SLC6A1; при этом, как и ожидалось, нейрон-специфические промоторы были слабее по сравнению с сильными и повсеместно встречающимися промоторами CAG. Увеличенные изображения трансфицированных AD-HEK293 и Neuro-2A показывают, что SLC6A1, экспрессируемый этими плазмидами, локализуется на плазматической мембране, как и ожидалось (фигуры 4 и 5B).

Вестерн-блот анализ

Трансфицированные клетки AD-HEK 293 собирали в 1X буфере для лизиса клеток (Cell Signaling Technology™, Danvers, MA, USA), содержащем 1X коктейль ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Буфер для образцов с додецилсульфатом лития (LDS) с добавлением 10% восстановителя (оба препарата поставлялись Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA)) добавляли к белковым лизатам до конечной концентрации 1X. Образцы разделяли с помощью 1D-электрофореза в ДСН-ПААГ. Для каждого образца загружали 30 мкг белков на дорожку. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, USA) с использованием аппарата для полусухого переноса (Bio-Rad Laboratories™, Hercules CA). После переноса, мембраны инкубировали в блокирующем растворе (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, USA) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембраны инкубировали с блокирующим раствором, содержащим первые антитела, в течение ночи при 4°C. Для этого анализа использовали следующие первые антитела: кроличьи моноклональные антитела против GAT-1 (Abcam™, Cambridge, MA, USA) в соотношении 1:1000, кроличьи поликлональные антитела против GAT-1 (Cell Signalling Technology™, Danvers, MA, USA) в соотношении 1:1000, кроличьи поликлональные антитела против с-мус в соотношении 1:1000 (MilliporeSigma™, Burlington, MA, USA), кроличьи моноклональные антитела против HA в соотношении 1:1000 (Cell Signalling Technology™, Danvers, MA, USA), мышинные моноклональные антитела против GAPDH в соотношении 1:1000 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, US), кроличьи моноклональные антитела против GAPDH в соотношении 1:1000 (Cell Signalling Technology™, Danvers, MA, USA). Мембраны трижды промывали раствором PBST, помещали в блокирующий раствор, содержащий козы антимышинные вторые антитела IRDye 800CW или 680LT или козы антикуриные вторые антитела (1:15000; Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, USA), подходящие для обнаружения в дальнем красном спектре в течение 1 часа при комнатной температуре. Белки

визуализировали с помощью устройства для формирования изображений в дальнем красном диапазоне спектра Li-Cor Odyssey CLx (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, USA).

SLC6A1 представляет собой мембранный белок с 12 трансмембранными доменами и является гликозилированным (Bennett, ER and BI Kanner. J Biol Chem. 272, 1203-1210, (1997)). Молекулярная масса мономера SLC6A1 в восстанавливающих условиях прогнозируется на уровне ~ 70 кДа, и этот белок был обнаружен с помощью Вестерн-блот-анализа в виде димера и агрегатов с высокой молекулярной массой, предположительно из-за топологии его мембраны и посттрансляционных модификаций. Это соответствует паттерну полос, который был обнаружен для SLC6A1 как описано в литературе (Bennett, ER and BI Kanner. J Biol Chem. 272, 1203-1210, (1997)). Дополнительные полосы, обнаруженные в некоторых условиях при более низкой молекулярной массе, равной приблизительно 28 кДа, вероятно являются продуктами разложения SLC6A1. Обнаружение GAPDH было использовано в качестве контроля загрузки. Эти результаты показали, что устойчивая экспрессия была достигнута при использовании конструкций с мечеными N- и C-концами под контролем промотора CAG (фигура б). Аналогичные результаты были получены в том случае, когда белок был обнаружен с использованием антител против SLC6A1 в лизатах головного мозга, взятых из образцов человека и мыши (полосы на панели С, обозначенные Н и М).

Пример 3: Идентификация и анализ патогенных, вероятно патогенных и природных вариантов

База данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), имеющаяся в свободном доступе в архиве отчетов о взаимодействиях между человеческими вариантами и фенотипами с подтверждающими доказательствами, была использована для идентификации вариантов гена SLC6A1 с помощью поискового термина «SLC6A1» и «патогенный» или «вероятно патогенный». Список патогенных вариантов был дополнен мутациями, опубликованными в научной рецензируемой литературе и отобранными вручную из программы поиска PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием поисковых терминов «SLC6A1 и мутация», и эти мутации были определены авторами изобретения как патогенные для выявления дополнительных патогенных вариантов SLC6A1, не зарегистрированных в ClinVar.

Затем были идентифицированы патогенные и вероятно патогенные варианты, образованные в результате замены аминокислот в белке GAT-1 (Таблица 2А). Другие патогенные варианты, генерируемые сдвигом рамки считывания, или посредством делеции аминокислот, или мутаций, приводящих к образованию стоп-кодона, показаны в Таблице 2В.

Таблица 2А

Патогенные и вероятно патогенные варианты, возникающие в результате замены аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 18)	
R44W	G297R

R50L	A305T
S56F	G307R
G63S	V323I
N66D	A334P
G75R	V342M
G79R	A357V
F92S	G362R
G94E	L366V
G105S	F385L
Q106R	G393S
Y140C	S456R
C173Y	S459R
F270S	M487T
R277H	V511L
A288V	G550R
S295L	G79V
D52E	A367T
D52V	G112V
F53S	G232V

Таблица 2В

Патогенные и вероятно патогенные варианты, возникшие в результате других мутаций	
A358fs	N66fs
A9fs	R419fs
G457fs	R50fs
L113fs	S175fs
L408fs	V446fs
C74*	Q534*
Q397*	R479*
W135*	W235*
W500*	W532*
Y246*	Q199*
Q291*	I268fs
I148fs	S437fs

L363fs	T170fs
F174del	F294del

Помимо мутаций, вызванных заменами аминокислот, могут возникать и другие мутации. Одним из идентифицированных типов мутаций была мутация, включающая инсерцию или делецию нуклеотида, при которых число измененных пар оснований не делится на три, что приводит к образованию новой аминокислоты (сдвиг рамки считывания, обозначенный как fs в Таблице 2В). Если мутация нарушает правильную рамку считывания, то вся последовательность ДНК после мутации будет прочитана неправильно. Более конкретно, A358fs, как указано в Таблице 2В, означает, что аланин в положении 358 по сравнению с SEQ ID NO: 18 заменен из-за сдвига рамки считывания нуклеотидов, что приводит к образованию аномального белкового продукта с «неправильной» аминокислотной последовательностью.

Другой идентифицированный тип мутации представляет собой мутацию на уровне ДНК, которая удаляет один или более аминокислотных остатков в белке. Этот тип мутаций обозначен как делеция (del) в Таблице 2В. Так, например, F174del означает, что фенилаланин в положении 174 по сравнению с SEQ ID NO: 18 удален, и белок будет короче на 1 аминокислоту и будет отсутствовать Phe174.

И наконец, другим типом идентифицированных мутаций является введение стоп-кодона (обозначенного звездочкой (*)) в Таблице 2В), который указан здесь как, например, C74*, что означает, что трансляция белка останавливается в положении цистеина 74 по сравнению с SEQ ID NO: 18, и белок будет усечен, начиная с этого положения.

Природные варианты в здоровой популяции были получены из gnomAD (База данных агрегации геномов - <https://gnomad.broadinstitute.org/v2.1.1>), то есть, общедоступного контрольного набора данных, содержащего генетическую информацию из 60146 образцов, взятых от неродственных индивидуумов, с использованием запрашиваемого термина «SLC6A1». Варианты, взятые из контрольного набора данных, включают миссенс-варианты, приводящие к замене аминокислот; варианты с потерей старт-кодонов (точковую мутацию в последовательности ДНК, приводящую к потере старт-кодона AUG, что приводит к уменьшению уровня или к элиминации GAT-1); и варианты с увеличенным числом стоп-кодонов (точковую мутацию в последовательности ДНК, которая приводит к появлению нового стоп-кодона, что в конечном итоге приводит к уменьшению уровня GAT-1). Встречающиеся в природе варианты, приводящие к замене аминокислот, представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Природные варианты (по сравнению с SEQ ID NO: 18)				
Ala2Thr	Asp165Tyr	Arg277Ser	Ile434Met	Arg579His
Gly5Ser	Arg172Cys	Arg277Cys	Ser470Cys	Pro580Ser
Asp10Asn	Arg172His	Arg277Pro	Ile471Val	Pro587Ala
Gly11Arg	Phe174Tyr	Ser280Cys	Gly476Ser	Ala589Val

Ile13Thr	Ser178Asn	Asn310Ser	Arg479Gln	Ile599Val
Glu16Lys	Asn181Asp	Tyr317His	Lys497Asn	Met1 (вариант с потерей старт-кодона)
Glu19Gly	Asn181Lys	Ile321Val	Phe502Tyr	Glu411 (вариант с приобретением стоп-кодона)
Pro21Thr	Arg195His	Ser328Leu	Ile506Val	
Lys33Glu	Met197Leu	Met332Val	Ala509Val	
Val34Leu	Asp202Glu	Val337Ile	Thr520Met	
Asp40Asn	Lys206Glu	His347Arg	Gly535Val	
Asp43Glu	Arg211Cys	Ala354Val	Leu547Phe	
Lys76Asn	Ile220Val	Leu375Met	Met552Ile	
Asn77Asp	Ile220Asn	Ile377Val	Met555Val	
Ile84Phe	Ala221Thr	Ile405Val	Thr558Asn	
Phe87Leu	Val240Ala	Val409Met	Arg566His	
Ile91Val	Phe242Val	Leu415Ile	Gln572Arg	
Val142Ile	Tyr246Cys	Arg417Cys	Pro573Thr	
Thr156Asn	Arg257Cys	Arg417His	Pro573Ser	
Thr158Pro	Arg257His	Arg419Cys	Ser574Asn	
Asp165Asn	Thr260Met	Arg419His	Val578Ile	

Пример 4: Продуцирование вирусных частиц

Продуцирование AAV

Транс-плазмиды, содержащие последовательности Rep AAV2, за которыми следуют капсидные последовательности AAV9.hu14 (далее обозначаемые AAV9) или AAV природного типа (далее обозначаемые AAVtt) (аминокислотная последовательность которых представляет собой SEQ ID NO: 24 и 25, соответственно), были синтезированы de-novo с помощью ATUM™ (Newark, CA, USA). Хелперная плаزمида AAV pALD-X80 была приобретена у Aldevron, LLC™ (Fargo, ND, USA).

Нереплицирующиеся векторы AAV получали методом тройной трансфекции. Клетки Expi293 (Thermo Fisher™, Waltham, MA, USA) пассировали каждые 3-4 дня с использованием экспрессионной среды Expi293 (Thermo Fisher™, Waltham, MA, USA) в шейкерных колбах при плотности посева $3,0E+05$ - $3,5E+05$ клеток/мл. В заключительном пассаже перед началом эксперимента, клетки пассировали при $3,5E+05$ клеток/мл в шейкерных колбах 2×1000 мл при общем рабочем объеме 220 мл на вирусный препарат. Плотность жизнеспособных клеток вычисляли с использованием Vi-Cell Blu (Beckman

Coulter™, Pasadena, CA, USA). За день до трансфекции, в шейкерные колбы высевали $1,5E+06$ клеток/мл.

Комплекс для трансфекции создавали для каждой колбы следующим образом: 180 мкл полиэтиленимина (PEI) MAX в концентрации 1 мг/мл (Polysciences Inc™, Warrington, PA, USA) разводили в 1,5 мл бессывороточной среды OptiPRO (Thermo Fisher™, Waltham, MA, USA), встряхивали четыре раза с параметрами 8 и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Отдельно, 20 мкг цис-плазмиды (CAG-hSLC6A1), 30 мкг плазмиды Rep/Cap (AAV9 или AAV-tt) и 40 мкг хелперной плазмиды (pALD-X80) разводили в 1,5 мл бессывороточной среды OptiPRO, встряхивали четыре раза с параметрами 8 и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Эти две смеси затем объединяли, встряхивали четыре раза с параметрами 8 и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем комплексы для трансфекции добавляли в шейкерные колбы, содержащие клетки. Клетки культивировали вместе со смесью для трансфекции при 37°C при постоянном перемешивании со скоростью 125 об/мин.

Через 96 часов, в колбы добавляли буфер для лизиса AAV до конечной концентрации $1 \times$ (150 mM NaCl, 120 mM Трис-HCl [pH=8,0], 2 mM MgCl₂, 0,1% Тритон X-100) и бензоназу (MilliporeSigma™, Burlington, MA, USA) до конечной концентрации 50 ед./мл. Эту смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C при постоянном перемешивании со скоростью 125 об/мин. Смесь осветляли центрифугированием при $2250 \times g$ в течение 20 минут при 23°C. Образцы хранили при -80°C до проведения дальнейшего анализа.

Определение титра AAV

Каждый образец вынимали из среды -80°C и оставляли оттаивать при комнатной температуре на 15 минут. После оттаивания, образец быстро встряхивали и центрифугировали в течение одной минуты. Затем, 10 мкл образца добавляли в отдельные лунки 96-луночного ПЦР-планшета в комбинации с 10-кратным буфером для ДНКазы, 50 ед. ДНКазы и водой без ДНКазы (все от Promega™, Madison, WI, USA) до общего объема 100 мкл в каждой лунке.

Затем планшет переносили в термоячейку Bio-Rad™ (Hercules, CA, USA) и нагревали в течение 30 минут при 37°C, а затем охлаждали до 4°C. Затем образцы последовательно разводили, как описано в Таблице 4.

Таблица 4

Схема разведения образцов						
Стадия разведения	Промежуточный коэффициент разведения	Промежуточный образец	Промежуточный объем (мкл)	Объем разведения (мкл)	Общий объем (мкл)	Общий DF
D0	10	Образец, обработанный	100	NA	100	10

		й ДНКазой				
D1	1.5	D0	100	50	150	1,50E+0 1
D2	10	D1	10	90	100	1,50E+0 2
D3	3	D2	10	90	100	1,50E+0 3
D4	3	D3	10	90	100	1,50E+0 4
D5	3	D4	10	90	100	1,50E+0 5

Пять (5) мкл разведений D2, D3, D4 и D5 смешивали с 20 мкл смеси Master Mix для dd-ПЦР, состоящей из смеси Supermix для зондов (без dUTP; Bio-Rad™, Hercules, CA, USA), прямого праймера GATCCAGACATGATAAGATACATTG, обратного праймера GCAATAGCATCACAААТТТСАС, зонда 6-Fam/Zen/3'IB FQ: TGGACAAAACCACAАСТАГААТГСА и воды без ДНКазы до конечной концентрации 1×. Каждый образец анализировали с двумя повторностями в 96-луночном планшете для ПЦР.

Планшет запаивали фольгой, встряхивали в пульсирующем режиме и центрифугировали при 1000× g в течение 5 минут. Планшет помещали в капельный генератор Bio-Rad™ QX-200 и капли получали в соответствии с инструкциями производителя.

После образования капель, планшет запаивали фольгой и помещали в термоячейку Bio-Rad™, запрограммированную на выполнение цикла, описанного в Таблице 5.

Таблица 5

Параметры ПЦР-амплификации (все градиенты установлены на 2,5°С/сек.)			
Стадия цикла	Температура	Продолжительность	Число циклов
Активация фермента	95°С	10 минут	1
Денатурация	95°С	30 секунд	39
Отжиг/удлинение	56°С	1 минута	
Деактивация ферментов	98°С	10 минут	1
Выдерживание	4°С	Бесконечно	1

После завершения процедуры, планшет помещали в капельный генератор Bio-Rad™ QX200 для считывания капель в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию векторных геномов (ВГ/мл) определяли количественно по следующей формуле:

ВГ/мл: $X = [(aY)(1000/b)]D$

где: **X** представляет собой ВГ/мл;

a представляет собой объем реакционной смеси dd-ПЦР (25 мкл);

Y представляет собой результат dd-ПЦР в копиях на микролитр;

b представляет собой объем вектора для разведения в dd-ПЦР (5 мкл);

D представляет собой общее разведение исследуемого материала.

Критерии приемлемости анализа были определены следующим образом:

%CV между повторами должен быть $\leq 15\%$, и если он составляет $>15\%$, то один выброс может быть опущен. Если выброс был опущен, а %CV оставался $>15\%$, то анализ необходимо было повторить. %CV между разведениями должен быть $\leq 20\%$, а сообщаемые разведения должны представлять собой как минимум два последовательных разведения. Если %CV составляет $>20\%$, то разведение можно не проводить, при условии, что указанные разведения представляли собой как минимум два последовательных разведения. Если усредненные разведения по-прежнему превышали 20%, то анализ необходимо повторить. В каждой лунке с реакционной смесью должно быть ≥ 1000 подходящих капель. Если число капель составляет <10000 , то эту лунку исключали из анализа.

Количественное определение вирусных частиц с помощью ELISA капсида AAV

Титр вирусных частиц определяли для каждой конструкции с использованием наборов для ELISA на титрование AAV, разработанных для AAV9 и AAV2 (PROGENTM Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) в соответствии с инструкциями производителя. В случае AAV9, мышинное моноклональное антитело ADK9 использовали как для захвата, так и для детектирования. Для AAVTT, моноклональное антитело A20R использовали как в стадии захвата, так и в стадии детектирования. Промывки в полученном буфере для анализа $1 \times$ (ASSB) проводили между каждой стадией с использованием устройства для промывки микропланшетов Molecular DevicesTM (San Jose, CA, USA) AquaMax 4000. Образцы обнаруживали с помощью планшет-ридера Molecular DevicesTM SpectraMax M5e. Титры капсида были интерполированы из стандартной кривой и представлены в Таблице 6.

Таблица 6

Конструкция	Колба #	Капсид	Титр капсида (ВЧ/мл)	Всего вирусных частиц (ВЧ)	Титр (ВГ/мл)	Общий титр (ВГ)
CAG-hSLC6A1	1	AAV9	4,43E+11	2,92E+13	7,37E+09	4,86E+11
CAG-hSLC6A1	2	AAV9	5,49E+11	3,62E+13	7,53E+09	4,97E+11
CAG-hSLC6A1	1	AAVtt	2,82E+11	1,86E+13	1,11E+10	7,29E+11
CAG-hSLC6A1	2	AAVtt	1,91E+11	1,26E+13	7,22E+09	4,77E+11

Титры вирусного генома, полученные с помощью dd-ПЦР, и титры капсида,

полученные с помощью ELISA, показали, что вирусные частицы как AAV9, так и AAVTT, содержащие вирусный вектор с нуклеиновой кислотой, содержащей промотор CAG, функционально связанный с трансгеном SLC6A1 человека, могут быть успешно получены.

Пример 5: Поглощение GABA in vitro мутантными формами SLC6A1

Были получены различные экспериментальные плазмиды, состоящие из промотора CAG, экспрессирующего последовательность hSLC6A1-WT, или описанные мутированные формы последней плазмиды (патогенные варианты: S295L, A288V, F270S, см. также Пример 3). Все плазмиды кодировали флуоресцентный белок (tagRFP) через систему внутреннего сайта связывания с рибосомой (IRES), позволяющего экспрессировать 2 независимых белка (фигура 7A). Это позволило подтвердить сходные уровни трансфекции в различных условиях.

Клетки COS7 (клеточную линию, подобную фибробластам обезьяны) высевали на сцинтилляционные микропланшеты и трансфицировали экспериментальными плазмидами, описанными выше, с использованием липофектамина 2000 и в соответствии с инструкциями производителя. Через 2 дня после трансфекции, уровень трансфекции проверяли с помощью эпифлуоресцентного микроскопа благодаря репортерному гену tagRFP. Все условия трансфекции были одинаковыми (данные не показаны). Затем клетки COS7 подвергали анализу на поглощение GABA. Вкратце, клетки промывали и обрабатывали специфическим ингибитором GAT-1 (CI-966 (Tocris, № по каталогу 1296), конечная концентрация 100 мкМ в 1% ДМСО) или только носителем (1% ДМСО) в течение 10 минут при 37°C. Затем клетки обрабатывали смесью тритий-содержащей и охлажденной GABA (конечные концентрации [3H]GABA 10 мкКи/мл и 15 мкМ GABA) в течение 10 минут при 37°C, и реакцию останавливали путем добавления 1 мМ холодной GABA перед количественным определением радиоактивности с помощью прибора Microbeta (PerkinElmer).

Как показано на фигуре 7B, описанные патогенные варианты SLC6A1 показали в анализе значительное снижение функционального поглощения GABA по сравнению с поглощением SLC6A1 дикого типа.

Пример 6: SLC6A1-опосредованное поглощение GABA при различных промоторах

Клетки SH-SY5Y (клеточную линию нейробластомы человека) трансфицировали конструкциями, как описано в Примере 1, с использованием липофектамина 3000 и в соответствии с инструкциями производителя. Позитивный контроль состоял из плазмиды, кодирующей hSLC6A1 под контролем промотора CAG, экспрессируемого вместе с флуоресцентным белком tagRFP, в то время как в качестве негативного контроля использовали соответствующую плазмиду без последовательности hSLC6A1. Через 2 дня после трансфекции, клетки SH-SY5Y были проанализированы на поглощение GABA с помощью любого ИСС-анализа. Вкратце, ИСС-анализ проводили следующим образом: клетки фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали первыми кроличьими

моноклональными антителами против GAT-1 (эталонный номер: ab177483; Abcam™, Cambridge, MA, USA) при 1:250. Затем, перед визуализацией, клетки окрашивали козьими антикроличьими вторыми антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, в соотношении 1:1000. Уровень трансфекции оценивали по количеству флуоресцентных клеток, и этот уровень показан в Таблице 7. Для анализа на поглощение GABA, клетки предварительно высевали на сцинтилляционные микропланшеты. Через 2 дня после трансфекции, клетки промывали и обрабатывали специфическим ингибитором GAT-1 (CI-966 (Tocris, № по каталогу 1296), конечная концентрация составляла 100 мкМ в 0,8% ДМСО) или только носителем (0,8% ДМСО) в течение 10 минут при 37°C. Затем клетки обрабатывали смесью тритий-содержащей и охлажденной GABA (конечные концентрации [3H]GABA 8 мКи/мл и 15 мкМ GABA) в течение 10 минут при 37°C, и реакцию останавливали путем добавления 1 мМ холодной GABA перед количественным определением радиоактивности с помощью прибора Microbeta (PerkinElmer).

Как показано в Таблице 7, конструкции были связаны с различными уровнями трансфекции rAAV на основе иммунологического окрашивания GAT-1. Кроме того, все промоторы давали экспрессию функционального белка GAT-1, о чем свидетельствует поглощение [3H]GABA, которое наблюдалось при обработке клеток носителем и ингибировалось при обработке клеток ингибитором GAT-1 (фигура 8).

Таблица 7

СAG (экспериментальный)	СAG	EF1a + интрон	GTVC-CMV	CMV	PGK	UBC	Меср2	Меср2 + интрон	hNSE1	СамКП	hSyn	hDLX	Эндо hSLC6A1 промотор
+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	++	+	+	++	+	++

Пример 7: Скрининг in vitro конструкций Prom-hSLC6A1 в остовах LVV

Линию iPSC с отредактированным геном, несущую DOX-индуцируемую экспрессию NGN2, дифференцировали в нейроны, происходящие от iPSC (линия BIONi010-C-13). В этом протоколе, фактор транскрипции NGN2 индуцировали доксициклином в течение 9 дней для инициации дифференцировки нейронов. В день in vitro (DIV) 21, нейроны NGN2, полученные из iPSC, трансдуцировали серийными разведениями лентивирусных векторов, экспрессирующих hSLC6A1 под контролем различных представляющих интерес промоторов. В DIV 28, анализ ICC проводили следующим образом: клетки фиксировали 2% параформальдегидом и окрашивали первыми кроличьими моноклональными антителами против GAT-1 (эталонный номер: ab177483; Abcam™, Cambridge, MA, USA) при 1:250. Затем, перед визуализацией, клетки

окрашивали козьими антикроличьими вторыми антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 568, в соотношении 1:1000. Визуализацию проводили с помощью прибора InCell Analyzer 6000 с использованием эмпирических параметров. Репрезентативные изображения показаны на фигуре 9 с настройками и параметрами, адаптированными для каждого изображения. Сравнение сигнала с нетрансдуцированными клетками позволило визуализировать транскрипцию и экспрессию hSLC6A1 под контролем различных промоторов по сравнению с эндогенным GAT-1 в нейронах NGN2, полученных из иПСК, то есть, в клеточной системе человека, которая не является иммортализованной клеточной линией.

Пример 8: Экспрессия выбранных кластеров in vitro и in vivo

Для дальнейшего исследования были выбраны четыре вирусных вектора, каждый из которых был охарактеризован по различным промоторам. Промотор CAG (CAG), промотор PGK (PGK), промотор hDLX (hDLX) и встречающийся в природе и эндогенный промотор SLC6A1 (обозначаемый здесь как ENDO) использовали для регуляции экспрессии SLC6A1 человека. Конструкции были сконструированы так, чтобы белок SLC6A1 экспрессировался с меткой HA на N-конце. Вирусный вектор, состоящий из hSyn-eGFP-NLS, использовали в качестве контроля (обозначаемого здесь как «контрольный AAV9»). Выбранные вирусные векторы были упакованы в AAV9 и протестированы in vitro и in vivo. Все эксперименты in vivo проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по этике проведения экспериментов на животных, изданными в соответствии с Бельгийским законодательством. Эксперименты проводили в соответствии с директивой Совета Европейского комитета (2010/63/EU). При этом, были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Клетки первичных кортикальных нейронов мыши получали из ткани коры головного мозга эмбрионов мышей E17. Ткани коры головного мозга диссоциировали с использованием папаина в течение 30 минут при 37°C и поддерживали в культуре в среде Neurobasal™ с добавлением 2% B27, 1 mM GlutaMAX-I и 50 единиц/мл пенициллина-стрептомицина. Замену половины среды проводили каждую неделю. На день 7 (DIV 7), нейроны трансдуцировали различными векторами AAV9 при множественности заражения 2 (2,5E+6 GC/клетку и 5,0E+5 GC/клетку). Уровень трансдукции оценивали с помощью «контрольного AAV9», и этот уровень был высоким при обоих условиях MOI (MOI или множественность заражения представляет собой отношение агентов, например, вируса, к мишеням инфекции, например, к клетке). На DIV 13, клетки фиксировали и окрашивали на различные маркеры. Во-первых, экспрессия трансгена SLC6A1 была продемонстрирована путем оценки позитивного окрашивания с использованием антитела против HA (1:100; Ref: 2367S, Cell Signaling Technology), которое совпадало с окрашиванием GAT-1 (1:200; Ref: ab177483; Abcam™, Cambridge, MA, USA). Совместное расположение наблюдалось у всех вирусных векторов. Во-вторых, проводили контрастное окрашивание с использованием антитела против MAP2 в качестве маркера для всех нейронов (1:5000; Ref: ab5392; Abcam™, Cambridge, MA, USA), антитела против GABA

(2,5 мкг/мл; Ref: A2052; Sigma) для идентификации GABA-эргических нейронов и антитела против GFAP (1:5000; Ref: ab7260; Abcam™, Cambridge, MA, USA) для идентификации астроцитов. Результаты (данные не показаны) подтвердили, что промотор hDLX регулирует экспрессию главным образом в GABA-эргических нейронах. Для сравнения, промоторы PGK и ENDO регулировали экспрессию в астроцитах, а в нейронах, они регулировали экспрессию по меньшей мере в GABA-эргических нейронах. Промотор ENDO показал лучшую клеточную специфичность для GABA-эргических нейронов, чем промотор PGK, а также давал паттерн экспрессии, который более соответствовал эндогенной экспрессии GAT-1, наблюдаемой в нетрансдуцированных клетках (дикого типа, без вирусных векторов, в контрольных условиях). Экспрессия посредством промотора CAG представляла собой сильную экспрессию и оказывала зависимое от MOI негативное влияние на развитие нейронной сети *in vitro*.

Экспрессию четырех выбранных вирусных векторов, упакованных в AAV9, *in vivo* исследовали путем билатеральной инъекции вирусных векторов в боковой желудочек самцов мышей C57BL/6J в день 1 после рождения, как описано в Таблице 8.

Таблица 8

Возраст на момент лечения	Способ доставки	Вирусный вектор	Титр
День 1 после рождения (PND 1)	Билатеральная ICV-инъекция, 2 мкл/полушарие	AAV9-CAG-HA-hSLC6A1	1.32E+13GC/мл
		AAV9-PGK-HA-hSLC6A1	1.33E+13GC/мл
		AAV9-hDLX-HA-hSLC6A1	1.27E+13GC/мл
		AAV9-ENDO-HA-hSLC6A1	1.23E+13GC/мл
		AAV9-hSYN-eGFP-NLS (Контрольный AAV9)	1.36E+13GC/мл
		Носитель-PBS (Стерильный забуференный фосфатом физиологический раствор 1X)	

Двум дополнительным группам мышей в качестве контроля вводили носитель-PBS или «контрольный AAV9».

В течение 5 недель после инъекции во всех группах животных (которым вводили носитель-PBS, контрольный AAV9, AAV9-CAG-HA-hSLC6A1, AAV9-PGK-HA-hSLC6A1, AAV9-hDLX-HA-hSLC6A1 и AAV9-ENDO-HA-hSLC6A1) проводили оценку жизненно важных функций (клинических признаков, побочных эффектов, увеличения массы тела и смертности). Разницу в массе тела определяли один раз в неделю для оценки общего состояния здоровья мышей. При этом, не было каких-либо существенных различий в приросте массы тела у различных групп, которым вводили различные вирусные векторы, вплоть до последней оценки. У мышей, которым вводили AAV9-CAG-HA-hSLC6A1, в течение 5-недельного мониторинга наблюдалось снижение выживаемости (показатель выживаемости 20%). Были достигнуты конечные точки выживаемости, и мышей подвергали эвтаназии между третьей и четвертой неделей после инъекции. У мышей, которым вводили AAV9-PGK-HA-hSLC6A1, также наблюдалось незначительное

снижение выживаемости (85% выживаемость) в течение 5-недельного мониторинга без проявления каких-либо клинических признаков токсичности. Что касается других групп, то ни у одной из контрольных мышей, которым вводили носитель-PBS, контрольный AAV9, AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1 или AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1, не наблюдалось никаких признаков заболевания.

Через 5 недель после инъекции, животному вводили PBS путем перфузии под анестезией изофлураном в соответствии с директивой Совета Европейского комитета (2010/63/EC). Головной мозг собирали, препарировали и подвергали биохимическому анализу, то есть, ДНК/РНК выделяли из левой лобной коры и гиппокампа, а белки экстрагировали из соответствующей правой лобной коры. Вкратце, экстракцию ДНК/РНК проводили с использованием мини-набора AllPrep (QiagenTM, 80204) в соответствии с инструкциями производителя и включая обработку ДНКазой для выделения РНК. Ткани лизировали в буфере RLT Plus (с добавлением бета-меркаптоэтанола) с использованием прибора Precellys 24 (Bertin Technologies). Затем определяли концентрацию ДНК и эту концентрацию доводили до 20 нг/мкл для всех образцов. Затем, 40 нг подвергали количественной ПЦР с использованием праймеров/зондов, специфичных для сигнала полиаденилирования SV40 (присутствующего во всех кластерах AAV). Количество геномов мышей анализировали с помощью набора ValidPrime® (tataabiocenter, A106P25). ValidPrime® является в высокой степени оптимизированным и специфичным для нетранскрибируемого локуса гДНК, который присутствует ровно в одной копии на гаплоидный нормальный геном. Как для SV40p, так и для ValidPrime®, абсолютные числа копий определяли с применением метода построения стандартной кривой. ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ) для 500 нг РНК осуществляли с использованием набора для проведения ОТ кДНК высокой емкости+ингибитор РНКазы (Applied Biosystems, № по каталогу 4374966). Затем, полученные кДНК подвергали количественной ПЦР сигнала полиаденилирования SV40, а для нормализации результатов использовали два эталонных гена. Относительную экспрессию определяли и масштабировали до среднего значения для всех групп. Для экстракции белка, ткани лизировали в RIPA-буфере (Pierce, 89900), включающем 2-кратный концентрированный коктейль ингибиторов протеазы и фосфатазы (Cell Signaling Technology, #5872), с использованием прибора Precellys 24 (Bertin Technologies) и системы охлаждения. Образцы оставляли на льду на 30 минут, центрифугировали и собирали супернатант в виде конечного белкового экстракта. Концентрацию белка определяли с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, 23227), 10 мкг белка смешивали с буфером Лэммли и бета-меркаптоэтанола и инкубировали при 30°C в течение 20 минут перед проведением электрофореза в ДСН-ПААГ. Гели переносили на нитроцеллюлозные мембраны, а затем подвергали стандартной процедуре WB. Вкратце, мембраны инкубировали в блокирующем растворе (Ref: 927-50000; Li-Cor) в течение 1 часа при 4°C. Первые антитела представляли собой кроличье моноклональное антитело против GAT-1 (1:2000; Ref: ab177483; AbcamTM, Cambridge, MA, USA), мышинное моноклональное антитело против NA (1:1000; Ref: 2367S,

Cell Signaling Technology) и мышинное моноклональное антитело против GAPDH (1:10000; Ref: G8795, Sigma). В качестве вторых антител использовали ослиное антитело против мышинных IgG IRDye® 680RD (1:20000; Ref: 926-68072, Li-Cor) и ослиное антитело против кроличьих IgG IRDye® 800CW (1:20000; Ref: 926-32213, Li-Cor).

Как показано на Фигуре 10, на панели А, в экстракте ДНК были обнаружены значительные копии вирусного генома на диплоидные геномы мыши, демонстрирующие эффективную и гомогенную трансдукцию AAV9 среди различных вирусных векторов. Вирусный вектор, содержащий промотор PGK, имел несколько сниженный уровень трансдукции. Анализ на экспрессию РНК выявил экспрессию трансгена во всех проанализированных вирусных векторах (фигура 10, панель В). Относительное сравнение позволило провести общее ранжирование силы промотора среди вирусных векторов для экспрессии мРНК SV40pA. Контрольная конструкция AAV9 давала высокий уровень экспрессии по сравнению с вирусными векторами с трансгеном SLC6A1. Среди них, вирусные векторы, содержащие промоторы PGK и ENDO (в последнем случае, наблюдалась более высокая экспрессия в гиппокампе), показали более высокую экспрессию, чем в случае промотора hDLX.

Анализ белков подтвердил результаты выделения ДНК и РНК с заметной сверхэкспрессией GAT-1 на тканевом уровне для обоих вирусных векторов, содержащих промоторы PGK и ENDO, по сравнению с контрольными группами (нетрансдуцированных животных, которым вводили носитель-PBS, или трансдуцированных животных, которым вводили контрольный AAV9) (фигура 11). Промоторы PGK и ENDO давали аналогичные уровни экспрессии белка GAT-1, в то время как промотор hDLX продемонстрировал более низкую, но все же детектируемую экспрессию.

Образцы головного мозга, взятые у других мышей, которым вводили AAV9-PGK-NA-hSLC6A1, AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1 и AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1, анализировали с помощью иммуногистохимического анализа. Свежезамороженные срезы (толщиной 12 мкм, в сагиттальной плоскости) получали с помощью криостата-микротомы фирмы QPS Austria (Австрия) и хранили при температуре -80°C . Все последующие стадии инкубирования проводили при комнатной температуре. Тройное иммунофлуоресцентное мечение проводили на срезах головного мозга мышей по следующему протоколу: срезы инкубировали с первыми антителами против NeuN (1:2000; Abcam, ab177487), против GFAP (1:2000; SySy, 173006) и против NA, конъюгированной с биотином (1:5000; Biolegend, 901505), разведенными в PBS, содержащем 0,3% Triton X-100, в течение ночи во влажной камере. После инкубирования, срезы промывали 3 раза PBS, затем инкубировали со вторыми куриными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, и со вторыми кроличьими антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 546, и с антителом, конъюгированным со стрептавидином и Alexa Fluor 647 (все они были разведены в PBS в соотношении 1:1000; и поставлялись от Thermo Fisher) в течение 1 часа. Затем их подвергали контрастному окрашиванию DAPI для мечения ядер клеток и промывали 3 раза

PBS. И наконец, срезы заливали средой, препятствующей выцветанию Prolong Gold (Life Technologies) и наносили покровное стекло. Цифровые изображения окрашенных срезов получали с помощью сканера предметных стекол AxioScan Z1 с 20× объективом (Zeiss). Иммунологическое мечение HA использовали для изучения распределения человеческого SLC6A1, сверхэкспрессированного с различных промоторов, включая эндогенный промотор PGK, DLX человека и SLC6A1.

Экспрессия белка GAT-1, обнаруженная с помощью метки HA под действием 3 различных промоторов, была детектирована по всему головному мозгу, в основном в полосатом теле, в гиппокампе, в коре головного мозга, в гипоталамусе, в паллидуме и в перегородке (фигура 12, панели C, F и I). Для промотора PGK, метка HA также наблюдалась в продолговатом мозге и в ядрах головного мозга (фигура 12, панель C).

Экспрессия GAT-1 также наблюдалась в гиппокампе со слегка различающимися паттернами в зависимости от промотора. При использовании всех 3 промоторов, окрашивание HA-метки наблюдалось в отростках нейронов, составляющих молекулярный слой зубчатой извилины, гиппокампа и stratum oriens (фигура 13, панели C, F и I). Кроме того, промотор hDLX приводил к экспрессии GAT-1 в аммоновом роге 3 (CA3) (фигура 13), в то время как промоторы PGK и ENDO приводили к экспрессии GAT-1 в астроцитах, которые были позитивными по GFAP (фигура 13, панели C и I).

Экспрессию GAT-1 наблюдали в нейропилях коры головного мозга (фигура 14, панели C, F и I). В частности, промоторы PGK и ENDO приводили к экспрессии GAT-1 в астроцитах, которые также были помечены GFAP.

Также была проведена оценка патологической безопасности выбранных тканей.

После фазы исследования *in vivo*, мозг разделяли в продольном направлении на два полушария, и одно полушарие использовали для патологического исследования. Одно полушарие головного мозга вместе со спинным мозгом, спинномозговыми узлами, печенью, почками, селезенкой, тимусом и глазами фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин, обрабатывали в восковых блоках, делали срезы толщиной приблизительно 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E).

Ряд тканей (головного мозга (7 поперечных срезов (Bolon et al. Toxicol Pathol 2018 Jun; 46(4):372-402. doi: 10.1177/0192623318772484)), спинного мозга со спинномозговыми узлами (6 поперечных или продольных срезов; шейного, грудного и поясничного отделов), печени (2 среза; левой и хвостатой доли), почек (2 среза; левого и правого органов), селезенки (1 срез), тимуса (1 срез) и глаз (2 среза, левого и правого органов)) от n=28 мышей оценивали с помощью оптической микроскопии.

В головном мозге, спинном мозге/спинномозговых узлах, в почках или в глазах не было выявлено каких-либо признаков, специфичных для группы обработки (пигментация пигментированного эпителия сетчатки у этих мышей дикого типа не позволила оценить содержание липофусцина/пигмента).

В головном мозге были отмечены некоторые изменения, которые рассматривались как результат механического (процедурного) повреждения при вскрытии или в результате

процедуры инъекции, характеризующейся артефактами темновых нейронов, иногда сопровождающимися нарушением архитектуры.

В печени у ряда животных, которым вводили контрольный AAV9, наблюдалась минимальная диффузная вакуолизация гепатоцитов, преимущественно в средней зоне, что также наблюдалось у отдельных животных, которым вводили вирусные векторы AAV9-CAG-NA-hSLC6A1, AAV9-PGK-NA-hSLC6A1 или AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1.

У некоторых животных, которым вводили вирусные векторы AAV9-CAG-NA-hSLC6A1 или AAV9-PGK-NA-hSLC6A1, были также отмечены повышенные митотические показатели (вплоть до легкой степени выраженности) в печени (иногда в почках, но это не было зафиксировано).

И наконец, двум животным из групп обработки, которым вводили вирусные векторы AAV9-CAG-NA-hSLC6A1 и AAV9-PGK-NA-hSLC6A1, также наблюдался минимальный некроз одиночных клеток гепатоцитов.

Другие результаты, такие как минимальная воспалительная клеточная инфильтрация, гиперемия и очаговый некроз, рассматривались как лежащие в пределах спектра ожидаемых нормальных фоновых изменений и не считались связанными с вирусными векторами. Животные, которым вводили AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1, имели морфологию печени, соответствующую нормальному фоновому диапазону.

В селезенке отдельных животных, которым вводили вирусные векторы AAV9-CAG-NA-hSLC6A1, AAV9-PGK-NA-hSLC6A1 или AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1, наблюдались уровни экстрамедуллярного гемопоэза от минимального до незначительного. Считалось, что это, вероятно, отражает связанное с тестируемым изделием снижение ожидаемой гемопоэтической клеточной архитектуры в этой ткани (зарегистрировано как умеренное у контрольных животных).

Пример 9. Оценка выбранных вирусных векторов *in vivo* у трансгенных мышей с моделью заболевания, ассоциированного с SLC6A1.

Для оценки эффективности выбранных вирусных векторов была создана модель трансгенной мыши, которая воспроизводит эпилепсию, опосредованную гаплонедостаточностью SLC6A1 человека. Используемая модель представляла собой нокаутированную (KI) мышиную модель на фоне C57BL/6J, несущую точковую мутацию S295L в гене SLC6A1 (SLC6A1^{+S295L}), полученную в Shanghai Model Organisms. Мутация S295L была функционально подтверждена *in vitro*, и приводила к полной потере функции GAT-1. Считается, что мутация происходит в области, которая, как было показано, содержит патогенные мутации и была обнаружена у пациента с абсансами и с задержкой развития (<https://slc6a1connect.org/>). Все эксперименты *in vivo* проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по этике экспериментов на животных, изданными в соответствии с Бельгийским законодательством. Эксперименты проводили в соответствии с директивой Совета Европейского комитета (2010/63/EU). Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Гетерозиготным KI (SLC6A1^{+S295L}) и однопометным самцам мышей дикого типа

(SLC6A1^{+/+}) билатерально вводили в боковой желудочек один из 3 вирусных векторов (AAV9-PGK-NA-hSLC6A1, AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1 и AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1) в 1-й день после рождения, как описано в Таблице 9.

Таблица 9

Генотип	Возраст на время обработки	Способ доставки	Вирусный вектор	Титр	Размер образца	Оценка жизненно важных функций	Мониторинг приступов
НЕТ (KI)	День 1 после рождения PND1	Билатеральная ICV-инъекция 2 мкл/полушарие	AAV9-PGK-NA-hSLC6A1	1,33E+13GC/мл	10	Клинические признаки, побочные эффекты, увеличение массы тела и смертность в течение 7 недель после инъекции	ДА Беспроводная видеотелеметрия ЭЭГ in vivo (6-7 недель после инъекции)
			AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1	1,27E+13GC/мл	11		
			AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1	1,23E+13GC/мл	15		
			Носитель -PBS (стерильный фосфатно-солевой буфер 1X)	--	11		
Дикого типа	День 1 после рождения	Билатеральная ICV-инъекция	Носитель -PBS (стерильный	--	10		Нет

	PND1	2 мкл/полуш арие	ый фосфатно -солевой буфер 1X)				
--	------	------------------------	--	--	--	--	--

Одной дополнительной группе мышей каждого генотипа вводили носитель-PBS для использования в качестве контроля. Клинические признаки контролировали один раз в неделю в течение 3 недель после инъекции и ежедневно с 3 по 7 неделю после инъекции, чтобы оценить общее состояние здоровья мышей. Через 7 недель после инъекции проводили окончательную оценку головного мозга, плазмы и органов с помощью биохимического анализа, гистопатологии, иммуногистохимии и экспрессии трансгена.

При этом, каких-либо существенных различий в приросте массы тела в различных группах, которым вводили различные вирусные векторы, вплоть до последней оценки, не наблюдалось. В течение периода наблюдения (3-7 недель после инъекции) летальных исходов не наблюдалось.

Через шесть недель после инъекций в течение 1 недели проводили видеотелеметрические записи ЭЭГ (электроэнцефалограммы) *in vivo* для оценки возникновения эпилептических припадков. Мышам SLC6A1^{+S295L} были хирургически имплантированы подкожный передатчик телеметрии и кортикальные электроды ЭЭГ через 5 недель после инъекций. Операцию проводили в стерильных/асептических условиях. Мышей под анестезией (изофлураном в кислороде: индуцирование - 5% при 2 л/минуту, поддерживающая анестезия 2,5-1,5% при 1,5 л/минуту) помещали в стереотаксическую раму с грелкой, просверливали отверстия на поверхности черепа префронтальной коры (над брегмой) для регистрирующего электрода и на поверхности черепа мозжечка (за лямбдой) для электрода сравнения. После этого, передатчик ЭКоГ с открытым исходным кодом (OSI) A3028S2 был имплантирован подкожно на спинку с прикрепленными проводами, проходящими подкожно до черепа, где регистрирующий электрод и электрод сравнения были расположены через каждое отверстие приблизительно на расстоянии 0,5 мм от паренхимы головного мозга. Каждый электрод был закреплен на месте с помощью винта (Plastics One). Вся конструкция удерживалась на месте с помощью цианоакрилата и стоматологического цемента, образуя небольшую круглую головку, а тыльная сторона была закрыта нейлоновым рассасывающимся шовным материалом. Послеоперационное лечение и обезболивание включали введение второй дозы карпрофена (10 мг/кг) через 24 часа после введения предоперационной дозы. После операции, мышей восстанавливали в теплой камере в течение 2-3 часов. Для записи беспроводной видеотелеметрии ЭЭГ, *in vivo* мышей содержали группами (2-3 мыши на клетку). Клетки с мышами помещали в камеры Фарадея для облегчения записи данных. Мониторинг состояния имплантированных мышей проводили один раз в день в течение 2 недель. Мышей взвешивали ежедневно в течение 4 дней, а затем еженедельно. Все записи

проводили в специально спроектированной комнате для записи с контролем температуры и влажности для того, чтобы уменьшить внешние помехи и улучшить прием передаваемых сигналов. Сигналы передавались по радио от имплантированного передатчика на антенны, расположенные внутри камер Фарадея. Сигнал ЭЭГ с одного канала регистрации оцифровывался с частотой 256 Гц (Фильтр с полосой пропускания: 0,3-80 Гц). Разряды зубцов S (SWD), типичные для абсансов, анализировали с помощью собственного программного обеспечения для автоматического обнаружения эпилептических припадков. Алгоритм обнаружения SWD был основан на анализе длительности события (>2 с), частотном анализе полосы (5-9 Гц) и определении конкретных частот основной гармоник. Каждый SWD, обнаруженный с помощью алгоритма, подтверждался как минимум одним опытным наблюдателем вслепую. Период высокой частоты SWD (5 часов с 13:00 до 18:00) первоначально наблюдался у трансгенной линии $SLC6A1^{+/S295L}$, не инъецированной вирусными векторами. Следовательно, анализ ЭЭГ был проведен в течение этого периода для различных вирусных векторов и контрольных групп. Всего из анализа было исключено 4 животных в связи с наличием у них технических артефактов в сигнале ЭЭГ в следующих группах: AAV9-PGK-NA-hSLC6A1 (2 из 10) и AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1 (2 из 15). Еще 2 животных были исключены из анализа в группе AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1 (2 из 11); один показал артефакт на ЭЭГ, а другой не был преобразован (отсутствие обнаружения копий вирусного генома в ткани головного мозга, как указано ниже). Различия между группами анализировали с помощью непараметрического одностороннего ANOVA (критерий Крускала-Уоллиса) с последующим апостериорным критерием множественных сравнений Данна (** $p < 0,01$).

Как показано на фигуре 15, среднее количество SWD в день, зарегистрированное в течение 7 дней подряд в часы пик возникновения SWD, было значительно снижено на 97% и 93% у мышей $SLC6A1^{+/S295L}$, которым вводили AAV9-PGK-NA-hSLC6A1 или AAV9-ENDO-NA-hSLC6A1, соответственно по сравнению с контрольной группой. Снижение количества SWD у мышей $SLC6A1^{+/S295L}$, которым вводили AAV9-hDLX-NA-hSLC6A1, не достигало в этом эксперименте статистической значимости по сравнению с контрольной группой.

Кроме того, был проведен биохимический анализ тканей головного мозга животных, которым вводили различные вирусные векторы. Животных умерщвляли через 7 недель после инъекции в соответствии с той же методикой, что была описана в Примере 8. Затем брали каудальную кору и подвергали экстракции ДНК/РНК, и соответствующую половину медиальной лобной коры использовали для экстракции белка с применением методики, описанной в Примере 8.

Как показано на Фигуре 16А, в экстрактах ДНК было обнаружено значительное количество копий вирусного генома на диплоидные геномы мыши, демонстрирующие эффективную и однородную трансдукцию AAV9 среди различных используемых вирусных векторов (за исключением одного животного в группе AAV9-hDLX, у которого

не было выявлено трансдукции вирусных векторов). На фигуре 16B показана экспрессия мРНК во всех группах, трансдуцированных AAV9. Существенной разницы между промоторами PGK и ENDO для экспрессии SLC6A1 не наблюдалось. С другой стороны, промотор hDLX показал значительное снижение экспрессии мРНК по сравнению с другими группами.

Анализ белка подтвердил, как и ожидалось, значительное снижение экспрессии GAT-1 у мышей SLC6A1^{+S295L} (обозначенных на чертежах как HET) по сравнению с однопометными мышами дикого типа (Фигура 17, панели D, E и F). Как показано на Фигуре 17, гели для Вестерн-блот-анализа и графики показывают, что экспрессия GAT-1 значительно увеличивалась после инъекции AAV9 мышам SLC6A1^{+S295L} по сравнению с мышами SLC6A1^{+S295L}, которым вводили носитель (обозначено на фигурах как HET). Сверхэкспрессия GAT-1 наблюдалась для всех используемых вирусных векторов. Промотор PGK увеличивал уровень экспрессии по сравнению с уровнями дикого типа (WT), в то время как промотор ENDO демонстрировал уровни экспрессии, сходные с уровнями экспрессии дикого типа, что устраняло гаплонедостаточность. Промотор hDLX также показал повышенную экспрессию по сравнению с мышами SLC6A1^{+S295L}. Подобно наблюдениям, описанным в Примере 8, у животных дикого типа, при рассмотрении сигнала HA можно сравнивать силу промоторов. Как наблюдалось ранее, промотор PGK продемонстрировал наибольшую экспрессию белка, а за ним следовали промоторы ENDO и hDLX у мышей SLC6A1^{+S295L}.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функцию GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val; Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 1, где трансген представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где указанный трансген предпочтительно содержит:

i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, предпочтительно SEQ ID NO: 15 или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1 или 2, дополнительно содержащая промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит:

a. SEQ ID NO: 1 или предпочтительно SEQ ID NO: 1, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 2; или

b. SEQ ID NO: 3; или

c. SEQ ID NO: 4; или

d. SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 35, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 6; или

e. SEQ ID NO: 7; или предпочтительно SEQ ID NO: 7, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 34; или

f. SEQ ID NO: 8; или

g. SEQ ID NO: 9; или

h. SEQ ID NO: 10; или

i. SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, или предпочтительно SEQ ID NO: 11, функционально связанную в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 12, где SEQ ID NO: 12 функционально связана в ориентации 5'-3' с SEQ ID NO: 13; или

j. SEQ ID NO: 14.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где конструкция содержит последовательность сигнала полиаденилирования, предпочтительно последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую SEQ ID NO: 17.

5. Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно в 5'ITR и 3'ITR.

6. Вирусный вектор по п. 5, где 5'ITR и/или 3'ITR содержат ITR природного аденоассоциированного вируса (AAV), такого как AAV2.

7. Вирусный вектор по любому из пп. 5 или 6, где 5'ITR содержит SEQ ID NO: 22 и/или 3'ITR содержит SEQ ID NO: 23.

8. Вирусная частица, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4 или вирусный вектор по любому из пп. 5-7.

9. Вирусная частица по п. 8, где вирусная частица содержит по меньшей мере капсидный белок VP1 от AAV, где указанный капсидный белок предпочтительно содержит AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (например, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (AAVtt), или их комбинации.

10. Вирусная частица по п. 9, где капсидный белок происходит от AAVtt и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

11. Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, кодирующий:

i. белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20; или

ii. последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, 19 или 20 и сохраняет функцию GAT-1; или

iii. встречающийся в природе вариант, содержащий, в отличие от SEQ ID NO: 18, одну или более мутаций, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из Ala2Thr; Asp165Tyr; Arg277Ser; Ile434Met; Arg579His; Gly5Ser; Arg172Cys; Arg277Cys; Ser470Cys; Pro580Ser; Asp10Asn; Arg172His; Arg277Pro; Ile471Val; Pro587Ala; Gly11Arg; Phe174Tyr; Ser280Cys; Gly476Ser; Ala589Val; Ile13Thr; Ser178Asn; Asn310Ser; Arg479Gln; Ile599Val;

Glu16Lys; Asn181Asp; Tyr317His; Lys497Asn; Glu19Gly; Asn181Lys; Ile321Val; Phe502Tyr; Pro21Thr; Arg195His; Ser328Leu; Ile506Val; Lys33Glu; Met197Leu; Met332Val; Ala509Val; Val34Leu; Asp202Glu; Val337Ile; Thr520Met; Asp40Asn; Lys206Glu; His347Arg; Gly535Val; делеции Met1; стоп-кодона после Glu411; Asp43Glu; Arg211Cys; Ala354Val; Leu547Phe; Lys76Asn; Ile220Val; Leu375Met; Met552Ile; Asn77Asp; Ile220Asn; Ile377Val; Met555Val; Ile84Phe; Ala221Thr; Ile405Val; Thr558Asn; Phe87Leu; Val240Ala; Val409Met; Arg566His; Ile91Val; Phe242Val; Leu415Ile; Gln572Arg; Val142Ile; Tyr246Cys; Arg417Cys; Pro573Thr; Thr156Asn; Arg257Cys; Arg417His; Pro573Ser; Thr158Pro; Arg257His; Arg419Cys; Ser574Asn; Asp165Asn; Thr260Met; Arg419His; или Val578Ile;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, а предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

12. Вирусный вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую трансген, который представляет собой ген члена 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ (SLC6A1), где указанный трансген предпочтительно содержит:

- i. SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29, а более предпочтительно SEQ ID NO: 15;
- ii. или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, или на 99,5% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, 26, 27, 28 или 29;

где указанный вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с указанным трансгеном, где указанный промотор предпочтительно содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14; где конструкция нуклеиновой кислоты, содержащаяся в указанном вирусном векторе, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, и где указанный вирусный вектор дополнительно содержит инвертированный концевой повтор (ITR) на 5'- и/или 3'-конце, фланкирующий указанную конструкцию нуклеиновой кислоты, а предпочтительно 5'ITR и 3'ITR.

13. Вирусный вектор по любому из пп. 11 или 12, где указанный трансген кодирует белок-переносчик гамма-масляной кислоты (GABA) 1 (GAT-1), содержащий SEQ ID NO: 18.

14. Вирусный вектор по любому из пп. 11-13, где последовательность сигнала полиаденилирования содержит SEQ ID NO: 17.

15. Вирусная частица, содержащая вирусный вектор по любому из пп. 11-14.

16. Вирусная частица по п. 15, где вирусная частица содержит по меньшей мере

капсидный белок VP1 от AAV, где указанный капсидный белок предпочтительно содержит AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (например, AAV, содержащий SEQ ID NO: 25), AAV10, AAV природного типа (AAVtt), или их комбинации.

17. Вирусная частица по п. 16, где капсидный белок происходит от AAV9 и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 25 или AAVtt и предпочтительно содержит SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая по меньшей мере на 98,5%, предпочтительно на 99% или на 99,5% идентична SEQ ID NO: 24.

18. Плаزمид, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4 или вирусный вектор по любому из пп. 5-7 или 11-14.

19. Клетка-хозяин для получения вирусной частицы по любому из пп. 8-10 или 15-17.

20. Клетка-хозяин по п. 18, где клетка-хозяин содержит:

а. конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4 или вирусный вектор по любому из пп. 5-7 или 11-14;

б. конструкцию нуклеиновой кислоты, предпочтительно плазмиду, кодирующую гены AAV гер и/или сар, которые не несут последовательности ITR; и, необязательно

с. конструкцию нуклеиновой кислоты, например, плазмиду или вирус, содержащие вирусные хелперные гены.

21. Способ получения вирусной частицы по любому из пп. 8-10 или 15-17, где указанный способ включает стадию:

а. культивирования клетки-хозяина по любому из пп. 18 или 19 в культуральной среде; и

б. сбора вирусных частиц из среды для культивирования клеток-хозяев и/или внутри клеток-хозяев.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, или вирусный вектор по любому из пп. 5-7 или 11-14, или вирусную частицу по любому из пп. 8-10 или 15-17, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями.

23. Вирусные частицы по любому из пп. 8-10 или 15-17 для применения в терапии.

24. Вирусные частицы для применения по любому из пп. 8-10 или 15-17 для лечения и/или профилактики заболевания, характеризующегося гаплонедостаточностью SLC6A1, где указанное заболевание предпочтительно включает моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими нарушениями; раннее начало развития и эпилептическую энцефалопатию, эпилептическую энцефалопатию, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническую атоническую эпилепсию (МАЕ), МАЕ-подобные и другие признаки эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрению, или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA или их комбинации.

25. Вирусная частица для применения по любому из пп. 23 или 24, где указанное

применение предназначено для восстановления функции GAT-1 и/или снижения частоты эпилептических припадков.

26. Вирусная частица для применения по любому из пп. 8-10 или 15-17, где указанное заболевание связано по меньшей мере с одной мутацией у пациента, которая приводит к возникновению патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций.

27. Вирусная частица для применения по п. 26, где указанная мутация включает, по сравнению с SEQ ID NO: 18, R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинацию.

28. Способ лечения и/или профилактики заболевания, характеризующегося гаплонедостаточностью SLC6A1, где указанное заболевание предпочтительно включает моногенные эпилепсии, сопровождающиеся когнитивными, моторно-поведенческими сопутствующими нарушениями; раннее начало развития и эпилептическую энцефалопатию, эпилептическую энцефалопатию, эпилептические синдромы с началом развития в детском возрасте, миоклоническую атоническую эпилепсию (MAE), MAE-подобные и другие признаки эпилепсии, такие как синдром Леннокса-Гасто, а также расстройства аутистического спектра и шизофрению, или заболевания, связанные с нарушением поглощения GABA или их комбинации в присутствии или в отсутствии аутизма и/или шизофрении, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, вирусных частиц по любому из пп. 8-10 или 15-17.

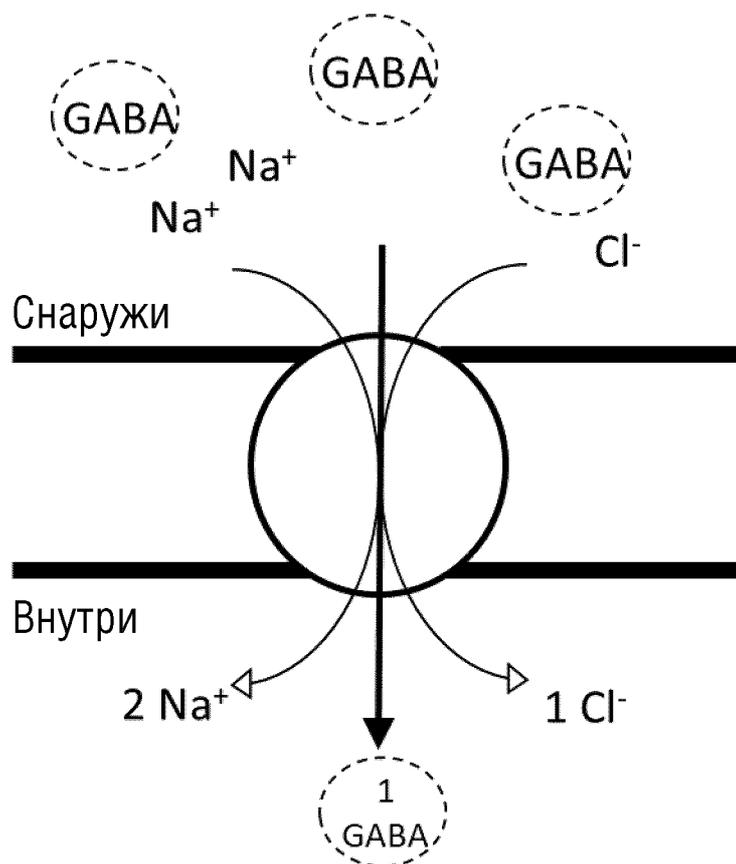
29. Способ по п. 28, где указанный способ предназначен для восстановления функции GAT-1 и/или снижения частоты эпилептических припадков.

30. Способ по любому из пп. 28 или 29, где указанное заболевание связано по меньшей мере с одной мутацией у пациента, которая приводит к образованию патологического варианта GAT-1, где указанные патологические варианты GAT-1 содержат мутацию или комбинации мутаций.

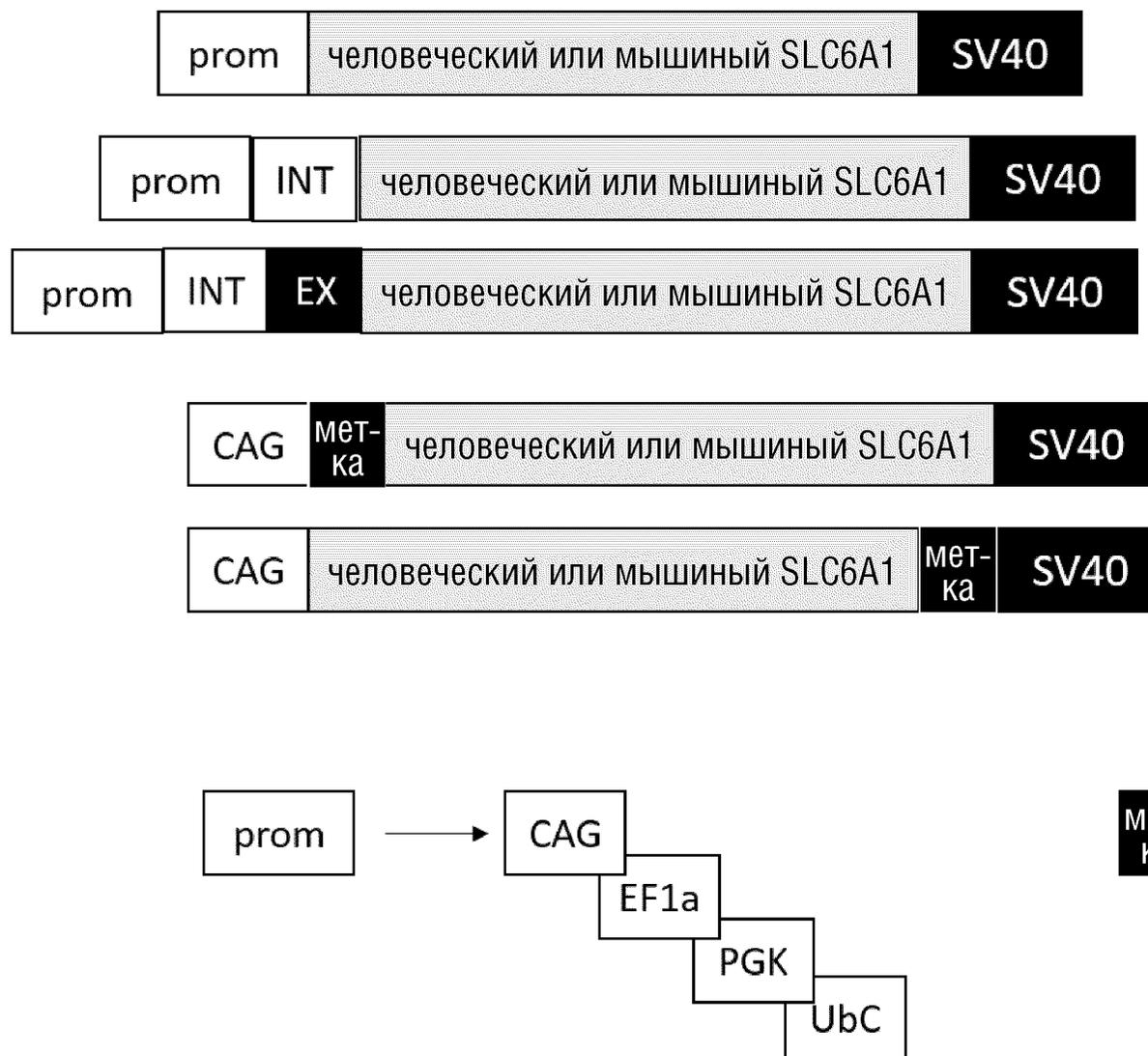
31. Способ по п. 30, где указанная мутация включает, по сравнению с SEQ ID NO: 18, R44W, R44Q, R50L, D52E, D52V, F53S, S56F, G63S, N66D, G75R, G79R, G79V, F92S, G94E, G105S, Q106R, G112V, Y140C, C173Y, G232V, F270S, R277H, A288V, S295L, G297R, A305T, G307R, V323I, A334P, V342M, A357V, G362R, L366V, A367T, F385L, G393S, S456R, S459R, M487T, V511L, G550R или их комбинации.

По доверенности

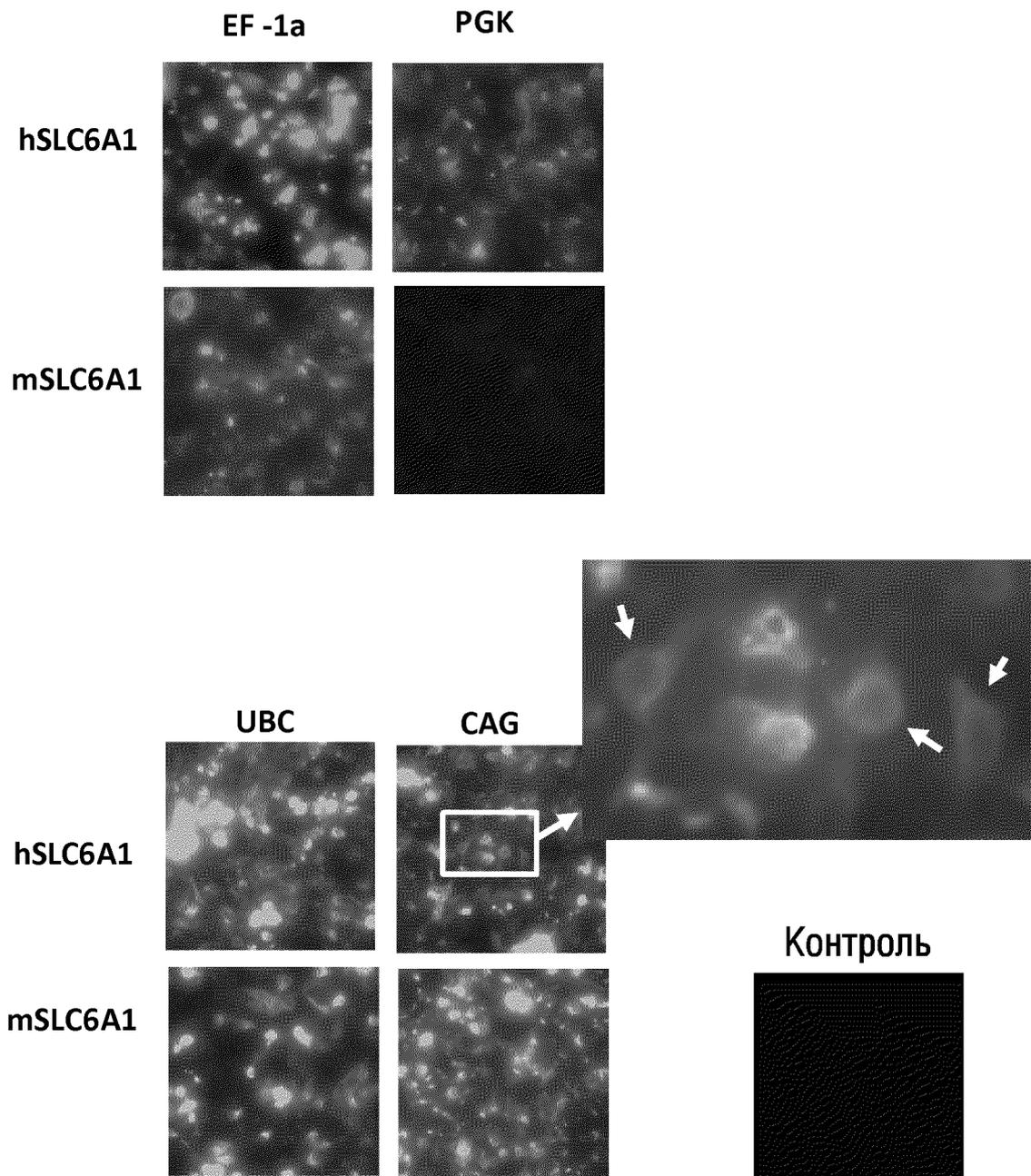
ФИГ.1



ФИГ.3

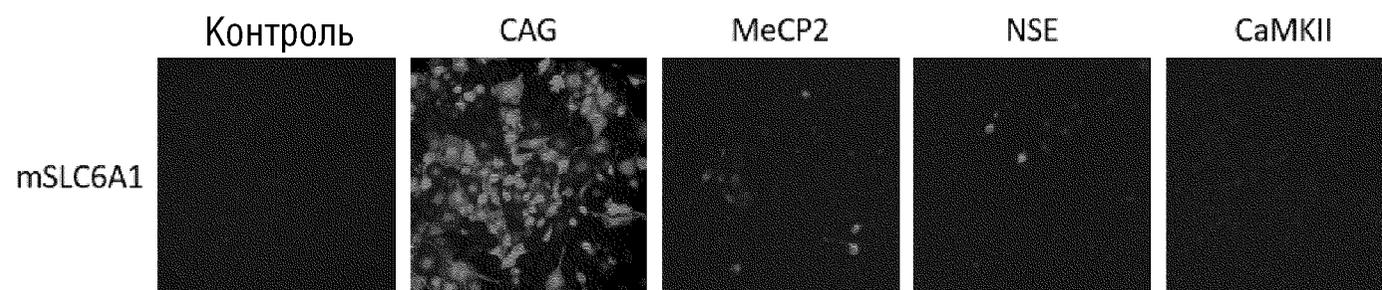


ФИГ.4

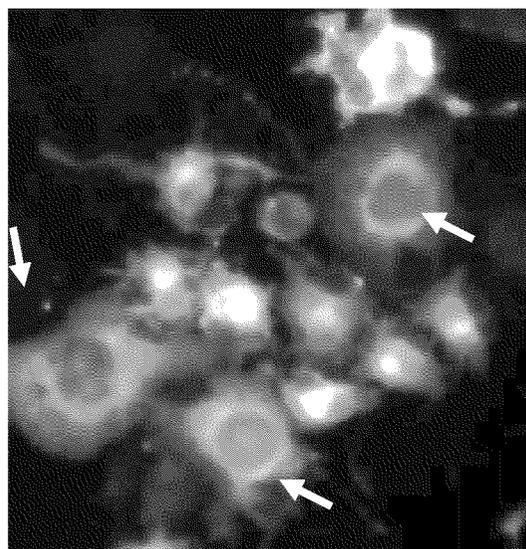


ФИГ.5

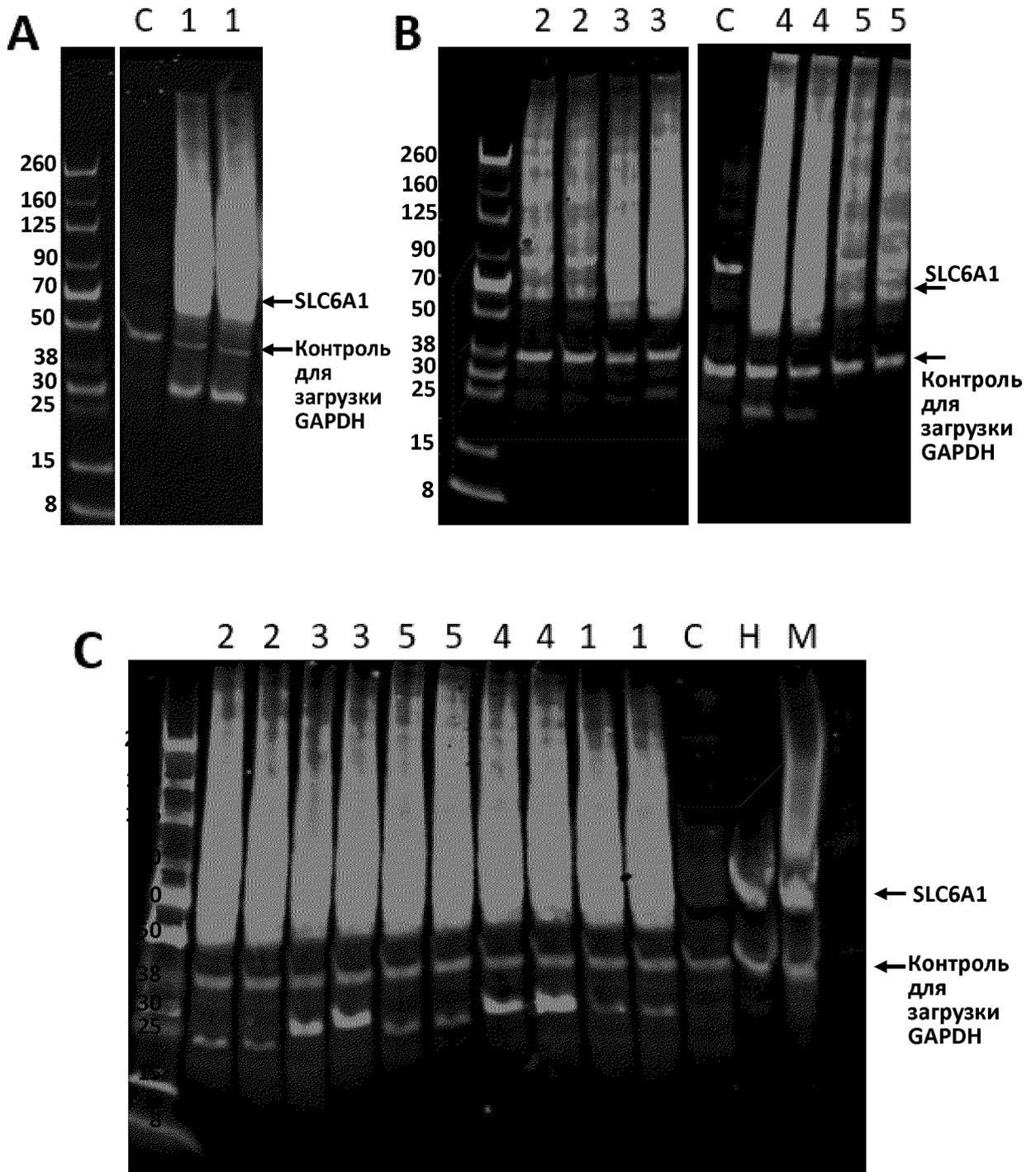
A



B

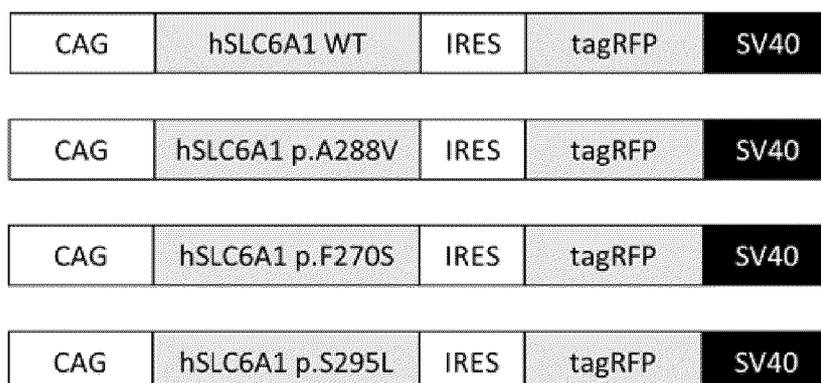


ФИГ.6

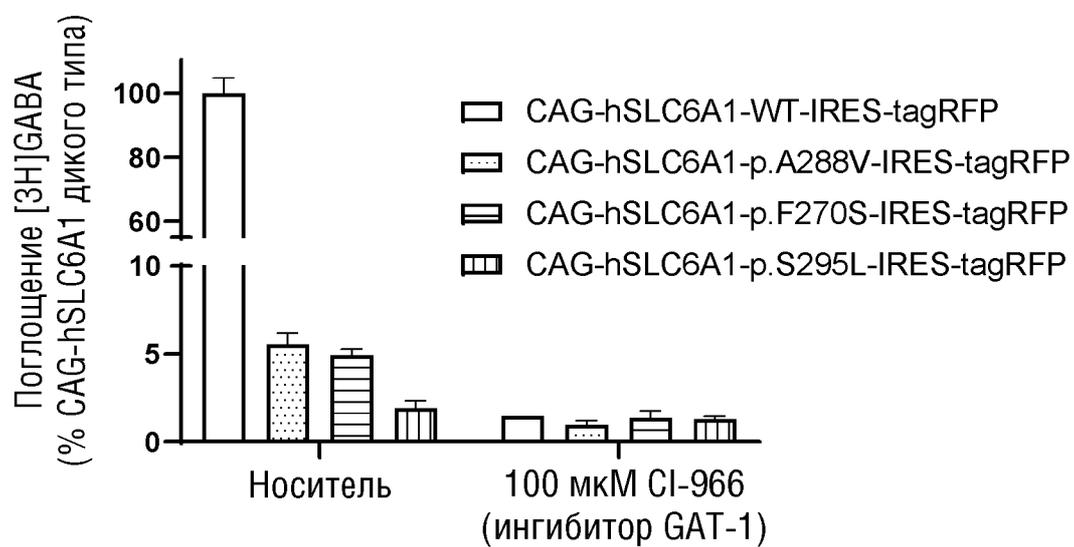


ФИГ.7

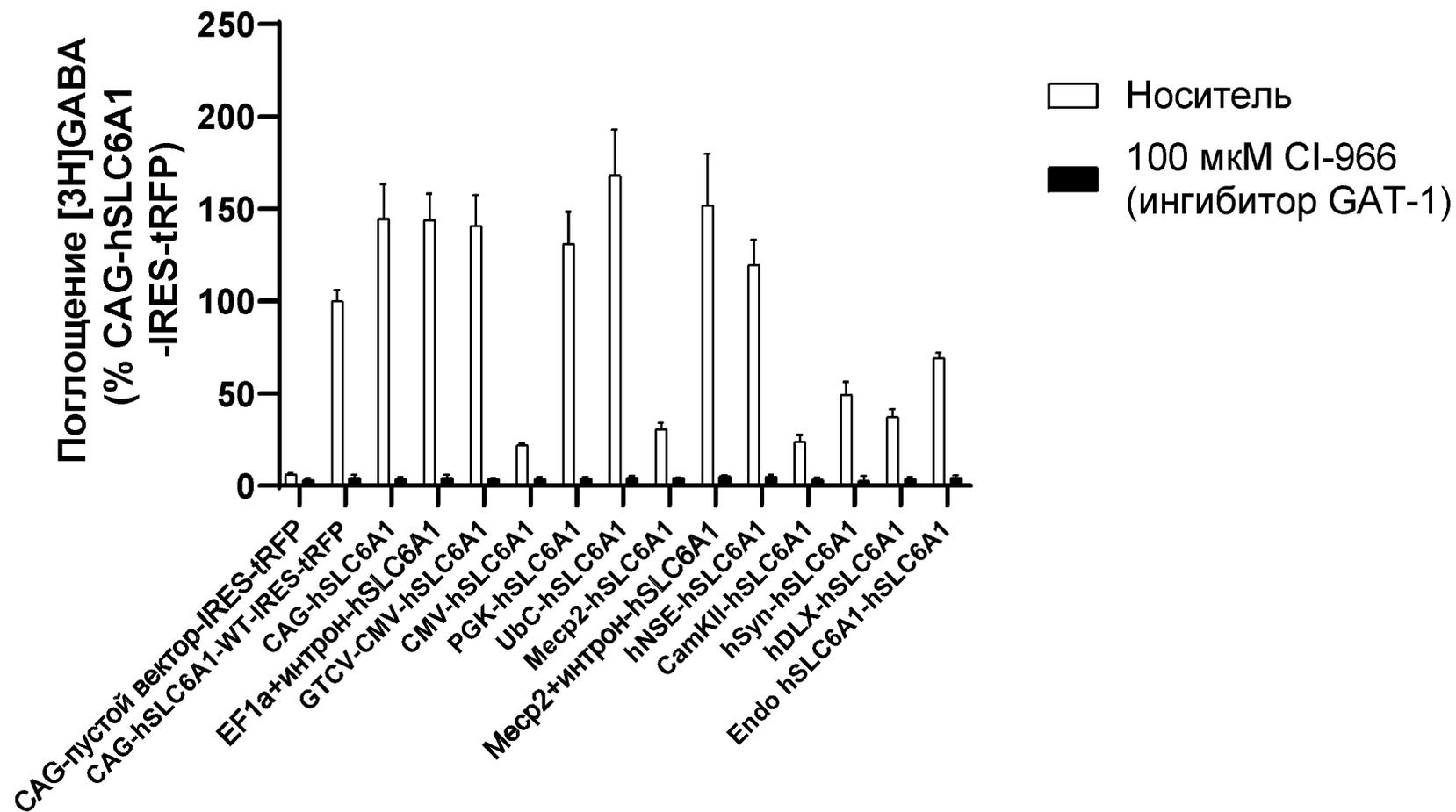
А



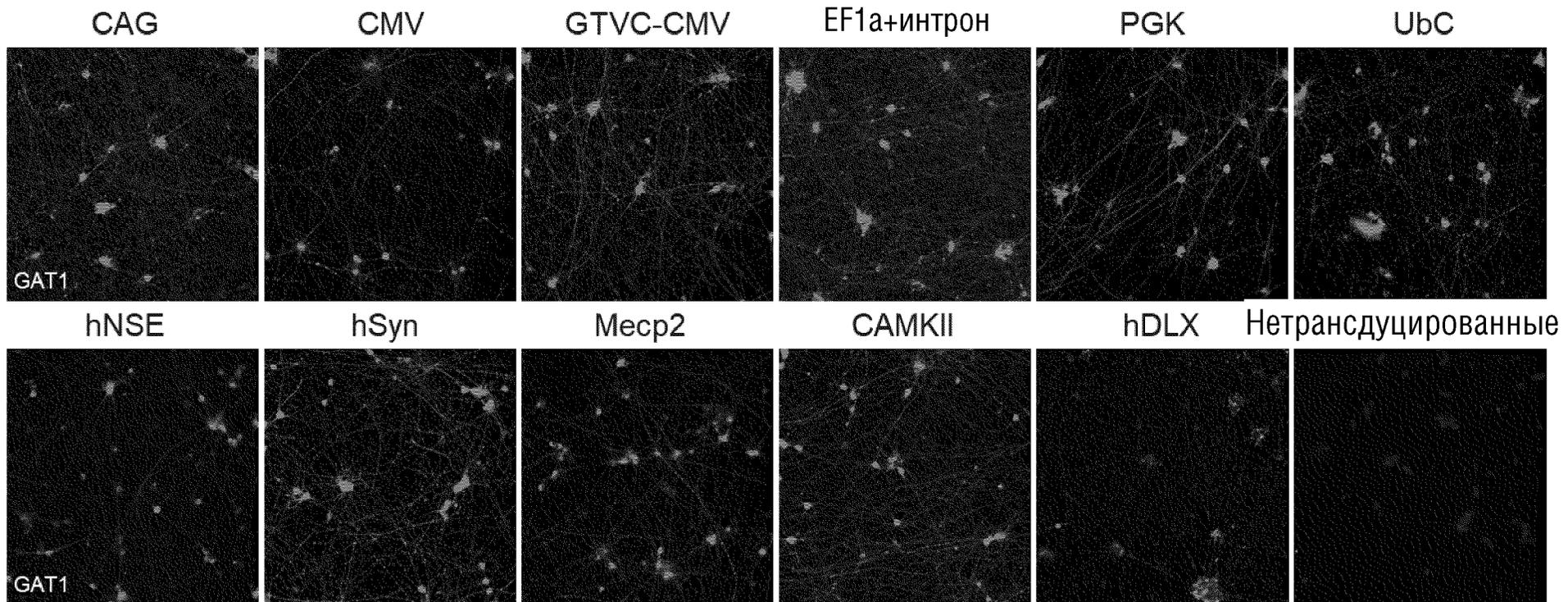
В



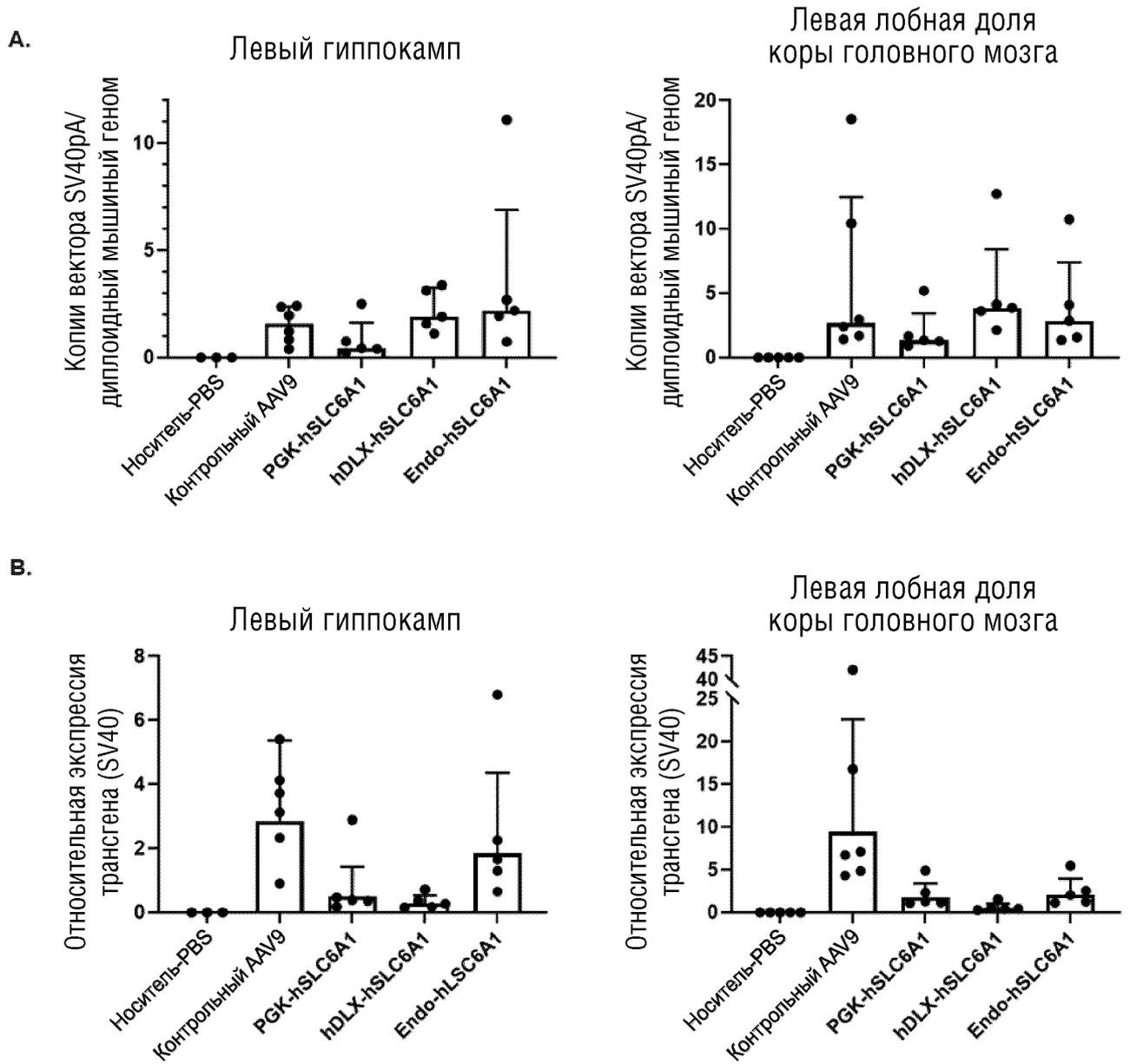
ФИГ.8



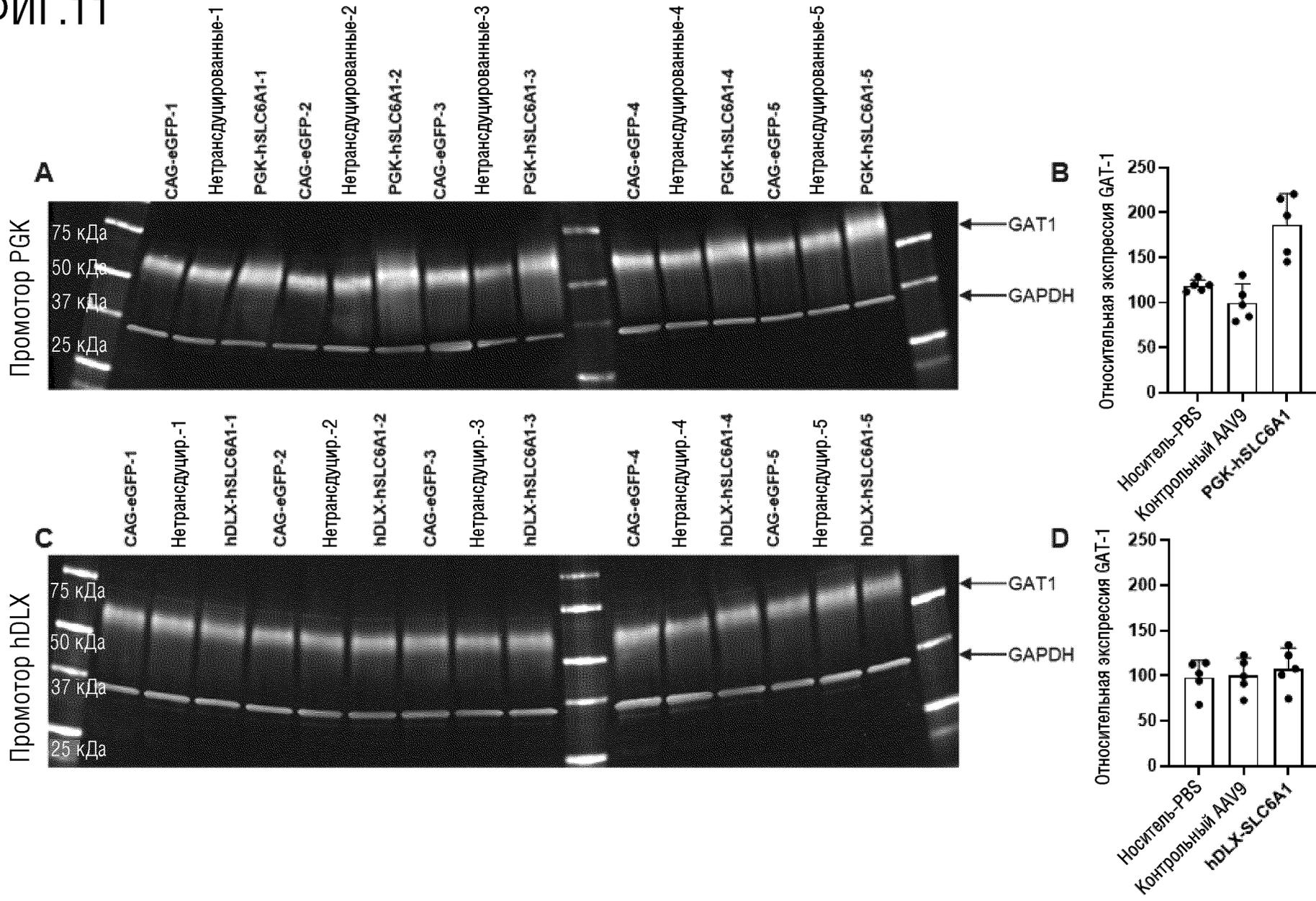
ФИГ.9



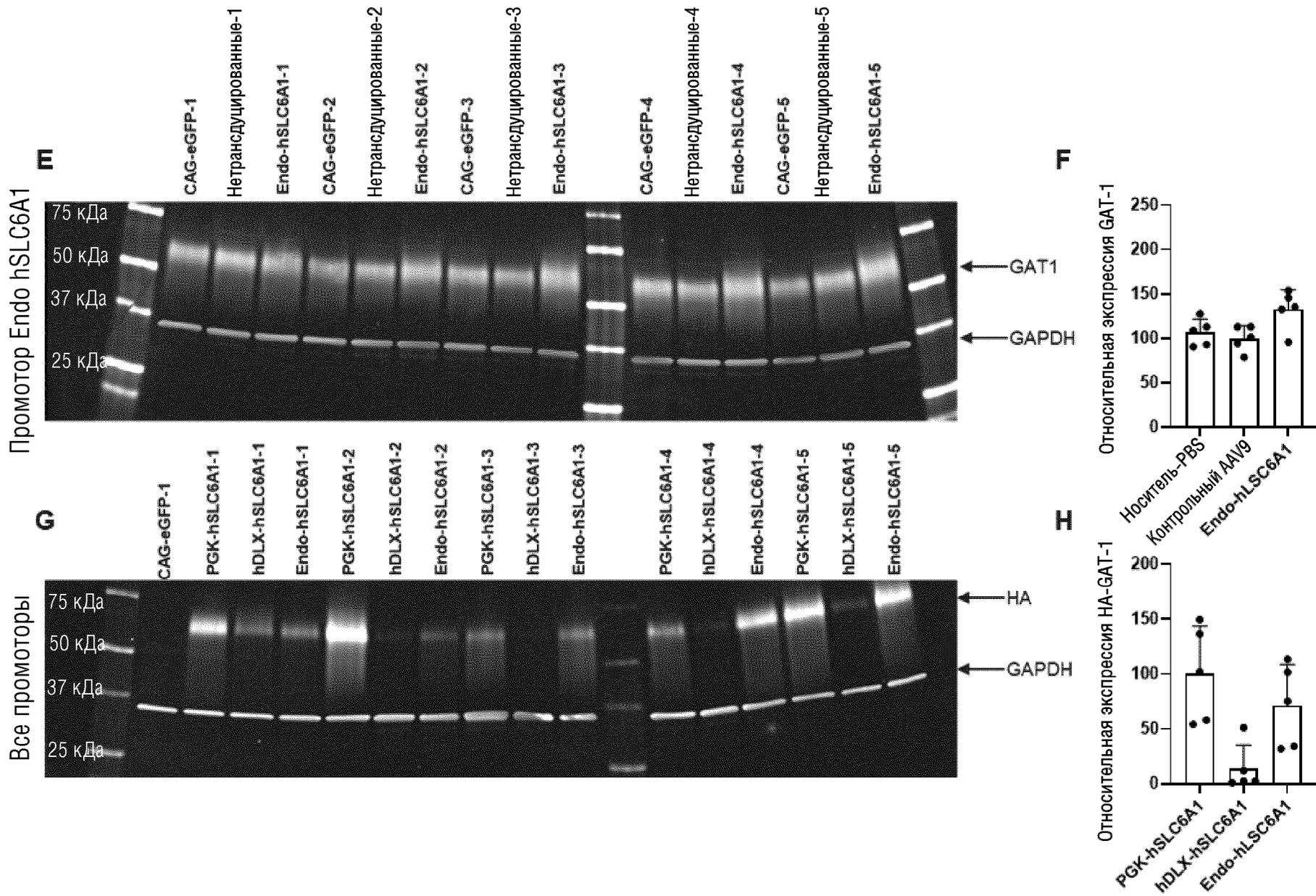
ФИГ.10

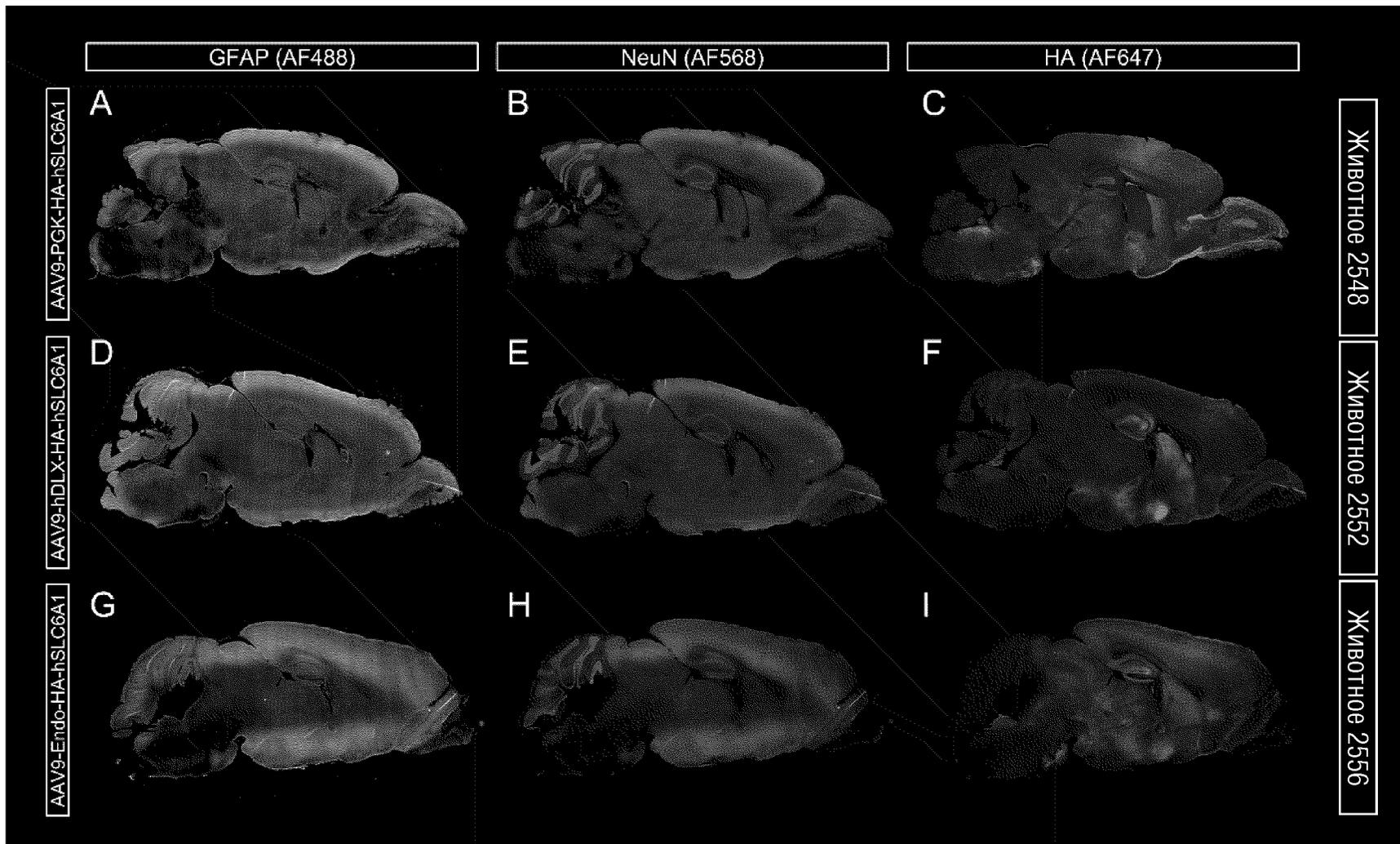


ФИГ.11

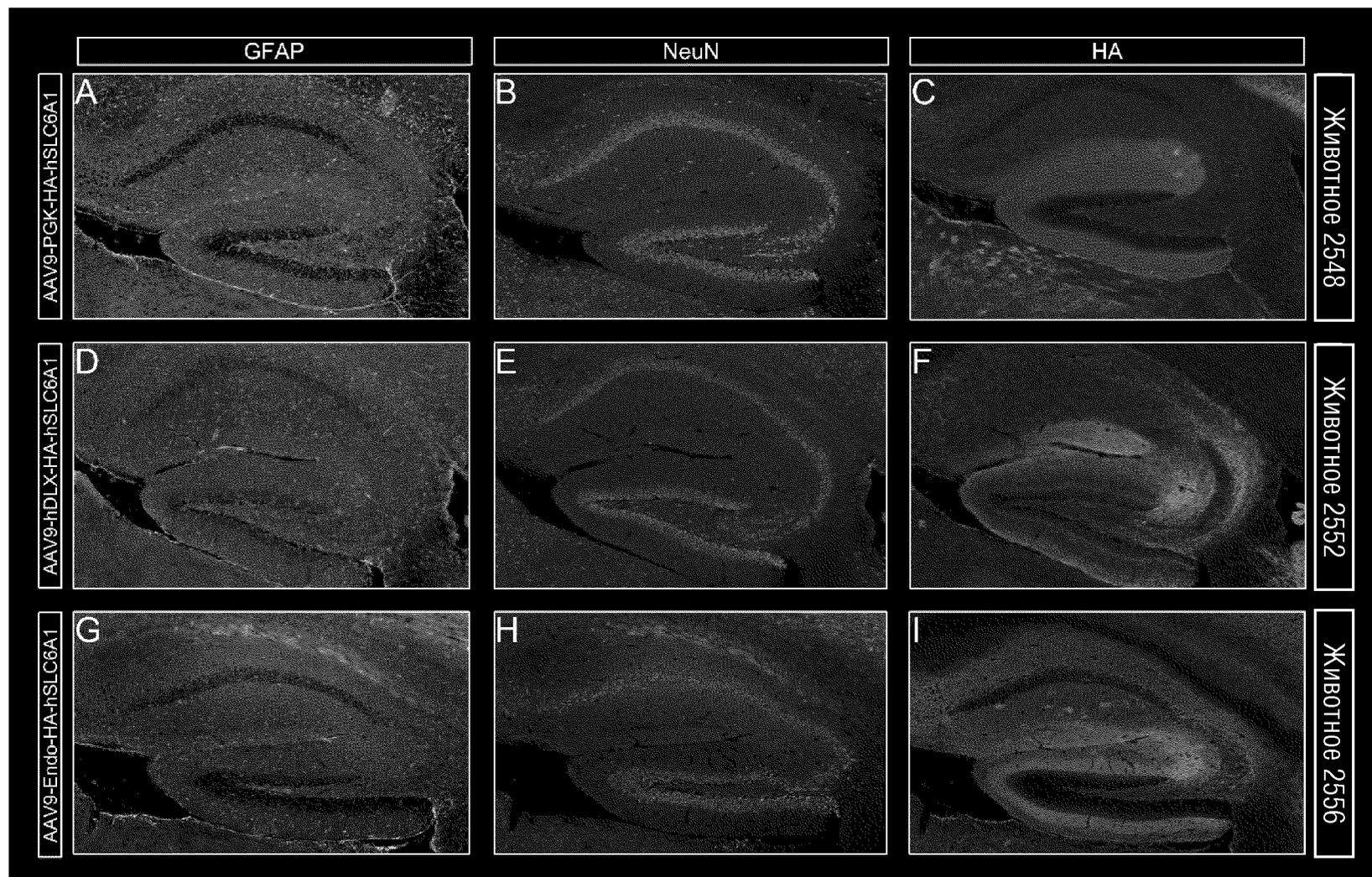


ФИГ.11 (продолжение)

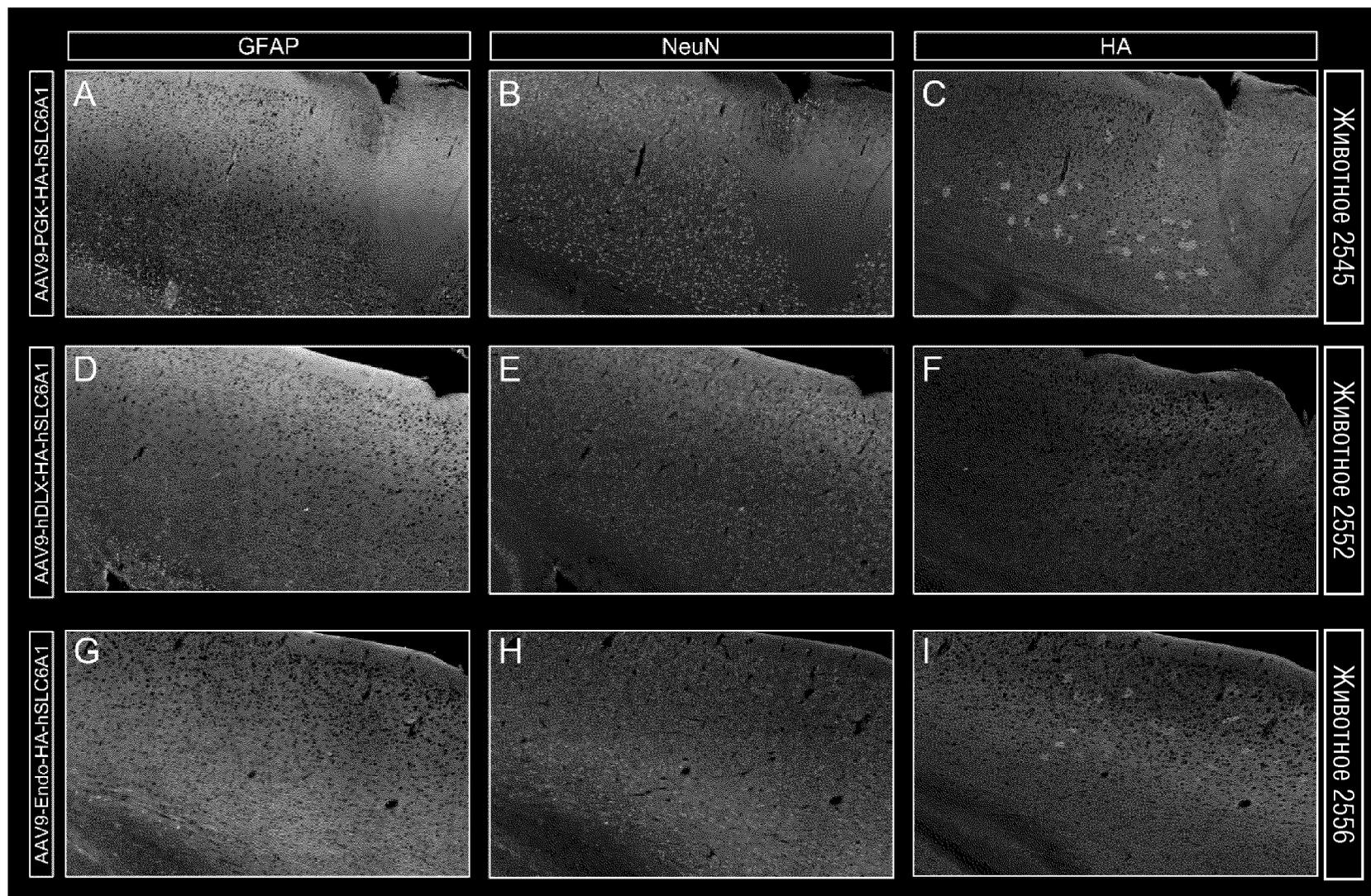




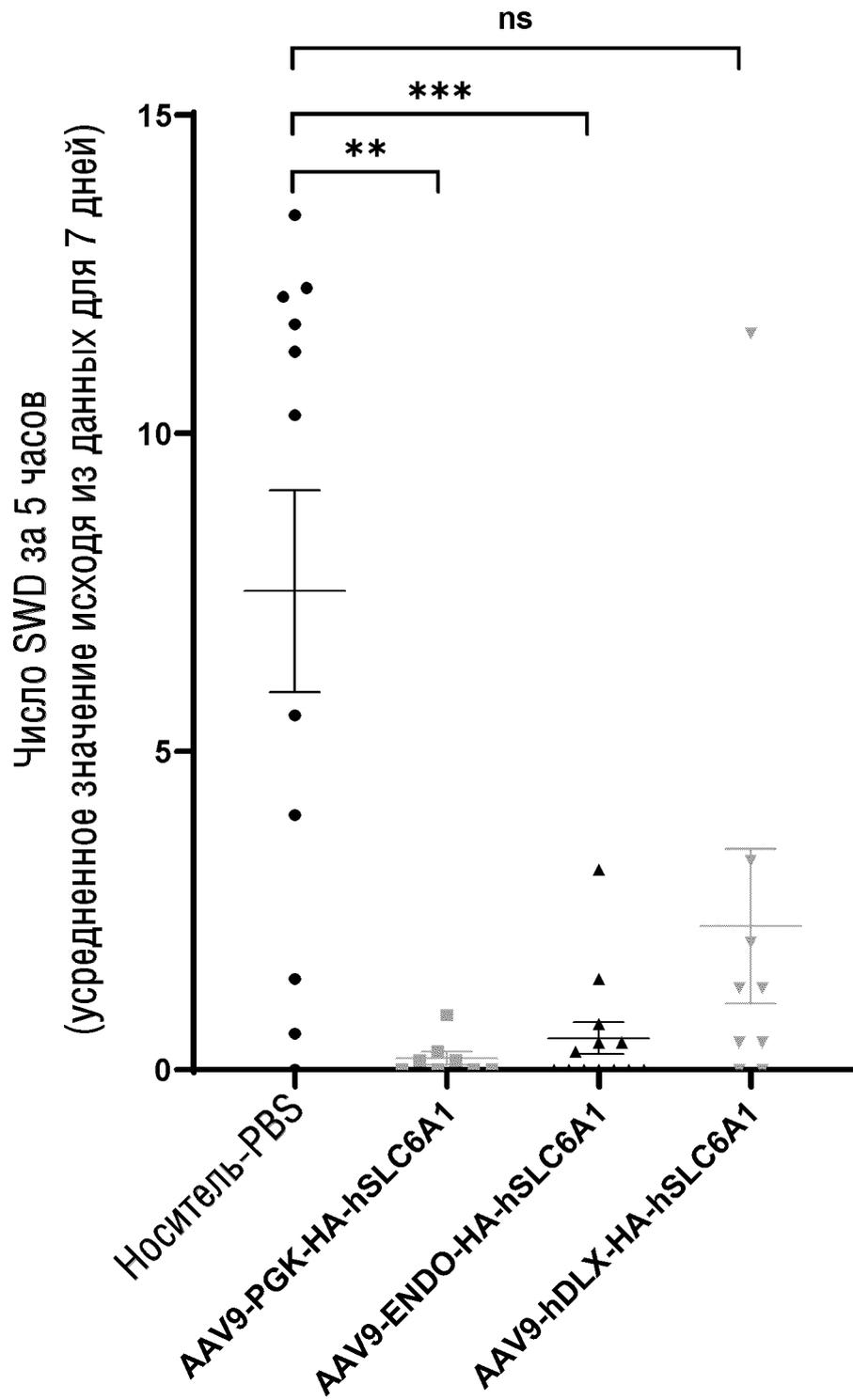
ФИГ.13



ФИГ.14

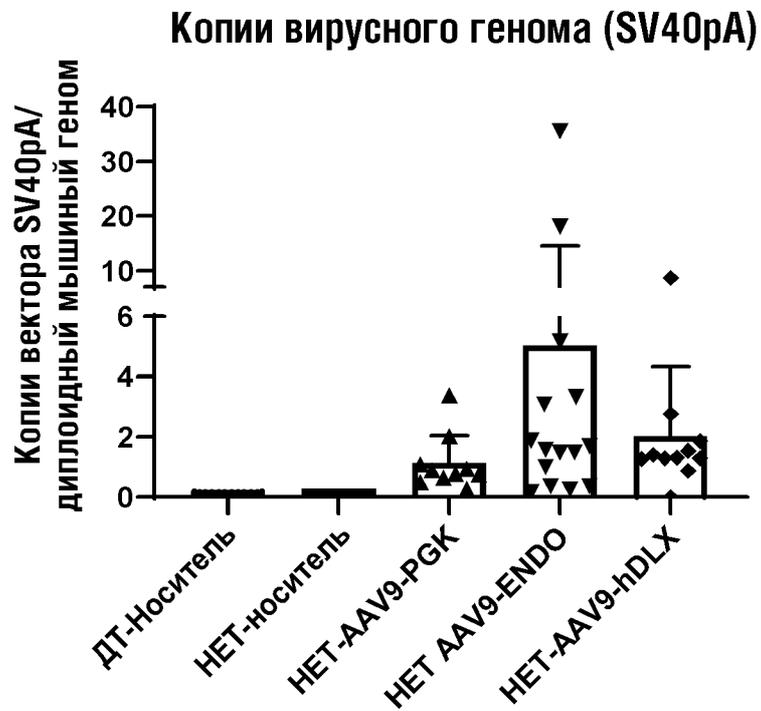


ФИГ.15

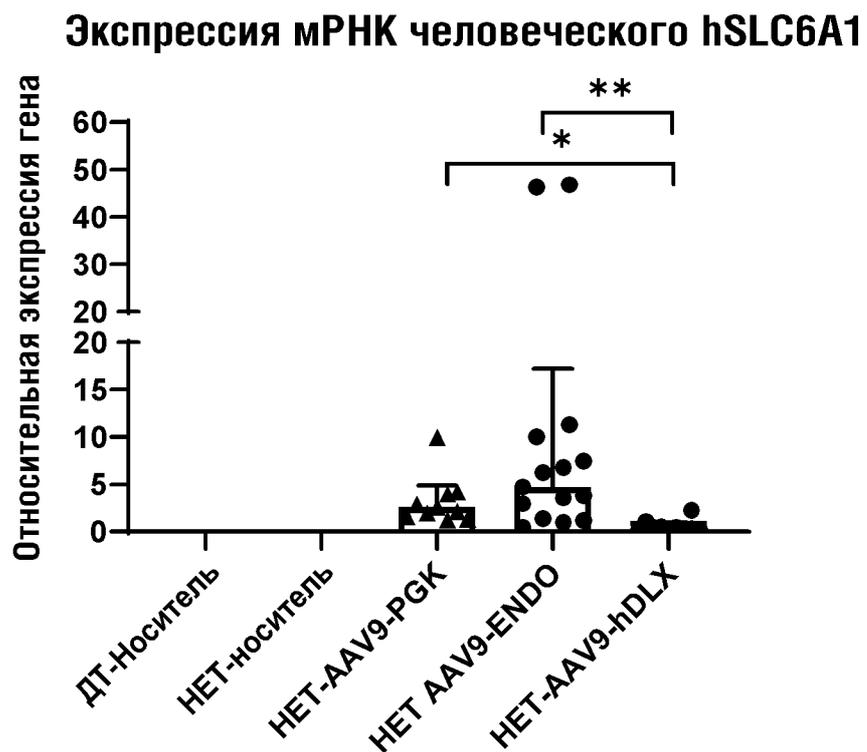


ФИГ.16

A.



B.



ФИГ.17 (продолжение)

