

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391800** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.24**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.01.28**

(51) Int. Cl. *C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)  
*C12N 15/861* (2006.01)  
*C12N 7/01* (2006.01)  
*A61K 35/761* (2015.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)

---

(54) **СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ SMN1 И miR-23a ПРИ ЛЕЧЕНИИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ**

---

(31) **2021102051**

(32) **2021.01.29**

(33) **RU**

(86) **PCT/RU2022/000025**

(87) **WO 2022/164351 2022.08.04**

(71) Заявитель:

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Мадера Дмитрий Александрович,  
Веселова Анна Сергеевна, Сюткин  
Алексей Сергеевич, Гершович Павел  
Михайлович, Морозов Дмитрий  
Валентинович (RU)**

---

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a, экспрессионной кассете и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV9 для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, фармацевтической композиции, которая включает данный рекомбинантный вирус, и различным вариантам применения вышеуказанного рекомбинантного вируса и вышеуказанной композиции.

---

**A1**

**202391800**

**202391800**

**A1**

## **Синергетическое действие SMN1 и miR-23a при лечении спинальной мышечной атрофии**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящая заявка относится к области биотехнологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 (белок выживаемости моторных нейронов) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a, экспрессионной кассете и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV9 (аденоассоциированный вирус 9 серотипа) для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, фармацевтической композиции, которая включает данный рекомбинантный вирус, и различным вариантам применения вышеуказанного рекомбинантного вируса и вышеуказанной композиции.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Спинальная мышечная атрофия (СМА/SMA) относится к группе нервно-мышечных заболеваний и характеризуется преимущественно аутосомно-рецессивным типом наследования. На сегодняшний день, как правило, под термином СМА понимается наиболее распространенная форма заболевания, развивающаяся вследствие мутаций и (или) делеций в гене SMN1 (survival motor neuron 1 – ген фактора выживания мотонейрона-1), расположенном на длинном плече 5-й хромосомы (5q11.2–q13.3) (Lefebvre et al., Cell (1995) 80:155-165). Заболевание сопровождается дегенерацией двигательных нейронов в вентральном (переднем) роге спинного мозга и/или стволе головного мозга, что ведет к гипотонии проксимальных групп мышц, отвечающих за основные двигательные навыки, например, ползание, ходьбу, удержание головы, а также к нарушению глотания и дыхания (Sumner C.J., NeuroRx (2006) 3:235-245). Таким образом, у пациентов со СМА большой риск развития дыхательной недостаточности и присоединения интеркуррентных заболеваний.

Генная терапия представляет собой перспективный способ лечения спинальной мышечной атрофии.

Аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы считаются эффективными для генной терапии ЦНС, поскольку они обладают подходящим профилем токсичности и иммуногенности, их можно использовать в трансдукции нервных клеток, и они способны опосредовать длительную экспрессию в ЦНС.

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой небольшой (20 нм), неспособный к самостоятельной репликации, безоболочечный вирус. У человека и приматов описано множество различных серотипов AAV. Геном аденоассоциированного вируса содержит (+ или -) одноцепочечную ДНК (ssDNA) длиной около 4,7 тысяч нуклеотидов. На концах молекулы

геномной ДНК располагаются инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeats, ITRs). Геном содержит две открытые рамки считывания (англ. ORF): Rep и Cap, содержащие в себе несколько альтернативных рамок считывания, кодирующих различные белковые продукты. Продукты Rep имеют важное значение для репликации AAV, при этом ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). При образовании рекомбинантного вектора AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ITR, упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, не входят в кассету. Рекомбинантный AAV считается самым безопасным и одним из наиболее широко используемых вирусных векторов для переноса генов *in vivo*. Векторы могут инфицировать клетки из тканей множества типов, обеспечивая мощную и устойчивую трансгенную экспрессию. Они также являются непатогенными и имеют низкий профиль иммуногенности (High KA et al., «rAAV human trial experience» Methods Mol Biol. 2011; 807:429-57).

Международные заявки WO2017106354 (A1), WO2010129021 (A1), WO2015060722 (A1), WO2017066579 (A1), WO2015158749 (A2) описывают различные варианты AAV с геном SMN1 и их применение.

### **Описание изобретения**

Авторами изобретения была разработана выделенная нуклеиновая кислота для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a, экспрессионная кассета и вектор на ее основе, а также рекомбинантный вирус на основе AAV9 для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, фармацевтическая композиция, которая включает данный рекомбинантный вирус, и различные варианты применения вышеуказанного рекомбинантного вируса и вышеуказанной композиции. Авторы изобретения неожиданно установили, что miR-23a усиливает функциональное действие эффекта SMN1 *in vitro* и установили синергетический эффект SMN1 и miR-23a при лечении СМА в животной модели данной болезни.

#### *Краткое описание изобретения*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 (белок выживаемости моторных нейронов) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает микроРНК miR-23a, которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую микроРНК miR-23a, которая включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и

нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;

сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот или любую из вышеуказанных кассет.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу на основе AAV9 (аденоассоциированный вирус 9 серотипа) для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, который включает капсид и любую из вышеуказанных кассет.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 включает белок VP1 AAV9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);  
CMV (цитомегаловирусный) энхансер;  
CMV (цитомегаловирусный) промотер;  
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;  
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);  
SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;  
сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и  
правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки гена SMN1 в целевые клетки, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для доставки гена SMN1 в целевые клетки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для выживаемости субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для обеспечения белком SMN1 субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу модуляции двигательной функции у субъекта с нарушением двигательных нейронов, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу обеспечения белком SMN субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки гена SMN1 в целевые клетки субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции субъекту со спинальной мышечной атрофией.

#### **Краткое описание чертежей**

Фигура 1 представляет собой график, показывающий экспрессию *SMN1* на уровне мРНК после нокдауна *SMN1* с помощью siRNA и трансдукции вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-miR-23a, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a. Клетки U-87 были трансфицированы 20 нмоль/л siRNA, специфичной к *SMN1* (или контрольной siRNA), после чего трансдуцированы вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-miR-23a, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a при MOI = 400000. Через 120 ч после трансдукции количество копий гена *SMN1* в каждом образце было определено с помощью количественной ПЦР (n = 3). Также было определено количество копий гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Все полученные количества для *SMN1* были нормализованы на количества копий гена *GAPDH* в каждом образце. Представлены данные по нормализованному среднему количеству копий *SMN1* с указанием стандартного отклонения.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий экспрессию SMN на уровне белка после нокдауна *SMN1* с помощью siRNA и трансдукции вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-miR-23a, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a. Клетки U-87 были трансфицированы 20 нмоль/л siRNA, специфичной к *SMN1* (или контрольной siRNA), после чего трансдуцированы вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-miR-23a, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a при MOI = 400000. Через 120 ч после трансдукции количество белка SMN в каждом образце было определено с помощью ИФА (n = 3).

Все полученные количества белка SMN (в пг) были нормализованы на общее количество белка в каждом образце (в мкг). Представлены данные по нормализованному среднему количеству белка SMN, с указанием стандартного отклонения.

Фигура 3 представляет собой график, показывающий экспрессию *miR-23a* после нокдауна *SMN1* с помощью siRNA и трансдукции вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-*miR-23a*, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-*miR-23a*. Клетки U-87 были трансфицированы 20 нмоль/л siRNA, специфичной к SMN1 (или контрольной siRNA), после чего трансдуцированы вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-*miR-23a*, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-*miR-23a* при MOI = 400000. Через 120 ч после трансдукции количество *miR-23a* относительно количества копий гена *GAPDH* в каждом образце было определено с помощью количественной ПЦР (n = 3), по методу  $\Delta\Delta C_T$ . Представлены данные по нормализованному среднему количеству *miR-23a*, с указанием стандартного отклонения. Относительное количество *miR-23a* в нетрансфицированном и нетрансдуцированном контроле принято за 100%.

Фигура 4 представляет собой график, показывающий экспрессию Senataxin после нокдауна *SMN1* с помощью siRNA и трансдукции вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-*miR-23a*, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-*miR-23a*. Клетки U-87 были трансфицированы 20 нмоль/л siRNA, специфичной к SMN1 дикого типа (или контрольной siRNA), после чего трансдуцированы вирусами AAV9-GFP, AAV9-GFP-*miR-23a*, AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-*miR-23a* при MOI = 400000. Через 120 ч после трансдукции количество Senataxin относительно количества белка Vinculin в каждом образце было определено с помощью Western blot. Представлен график нормализованной экспрессии Senataxin относительно Vinculin в экспериментальных образцах с указанием стандартных отклонений (n = 3). Относительное количество Senataxin в нетрансфицированном и нетрансдуцированном контроле принято за 100%.

Для фигур 1-4:

siNEG это негативный контроль siRNA,

siSMN1 это siRNA для SMN1.

Фигура 5 представляет собой график, показывающий кривые выживания мышей модели СМА, инъецированных вирусами AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-*miR-23a*. Также показаны кривые выживания животных, инъецированных плацебо, и контрольных мышей дикого типа (из того же помёта, что и опытные).

#### *Определения и общие методы*

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы

культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

«Выделенный» означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природе присутствующие в животном, не являются «выделенными», но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать, по существу, в очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, генетически модифицированной клетке.

Определения «встречающийся в природе», «нативный» или «дикого типа» используют для описания объекта, который можно обнаружить в природе как отличающийся от получаемого искусственно. Например, белок или нуклеотидная последовательность, присутствующие в организме (включая вирус), которые можно изолировать из источника в природе, и которые не модифицированы умышленно специалистом в лаборатории, являются встречающимися в природе.

Термин «геном» относится к полному генетическому материалу организма.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

#### *Белок (Пептид)*

В настоящем описании термины «пептид», «полипептид» и «белок» используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует ограничений по максимальному количеству аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как применяют в настоящем описании, термин относится и к коротким цепям, также общепринято обозначаемым в этой области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, как правило, обозначаемым в этой области как белки, множество типов которых существует. «Полипептиды» включают, помимо прочего, например, биологически активные фрагменты, по существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги,

слитные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

#### *Молекулы нуклеиновых кислот*

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

#### *Аденоассоциированный вирус (AAV)*

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, представители которого инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, представители которого инфицируют насекомых. К 2006 году были описаны 11 серотипов аденоассоциированного вируса (Mori, S. ET AL., 2004, «Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein», Virology, T. 330 (2): 375-83). Все известные серотипы могут инфицировать клетки многих видов тканей. Тканевая специфичность определяется

серотипом белков капсида, поэтому векторы на основе аденоассоциированного вируса конструируют, задавая необходимый серотип. Дополнительная информация по парвовирусам и другим представителям Parvoviridae описана в литературе (Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication», Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996)).

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее чем примерно 5000 нуклеотидов (нт) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности репликации неструктурных белков (Rep) и структурных белков (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид. Концевые 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильчатую структуру. Такие шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, являясь праймерами для клеточного ДНК-полимеразного комплекса. После инфекции клеток млекопитающих AAV дикого типа (wtAAV) гены Rep (например, Rep78 и Rep52) экспрессируются с помощью P5 промотора и P19 промотора, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Сплайсинг в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (например, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих.

### *Вектор*

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Кроме того, термин «вектор» в данном настоящем документе означает вирусную частицу, способную транспортировать нуклеиновую кислоту.

Как применяют в настоящем описании, термин «экспрессия» определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

### *Применение*

«Генная терапия» представляет собой вставку генов в клетки и/или ткани субъекта для лечения заболевания, обычно, наследственных заболеваний, при этом дефектный мутантный аллель заменяется или дополняется функциональным аллелем.

«Лечить», «лечение» и «терапия» относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, термин «облегчить» болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства

или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на «лечение» включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин «нарушение» означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению.

«Заболевание» является состоянием здоровья субъекта, где субъект не может поддерживать гомеостаз, и где, если заболевание не облегчают, то здоровье субъекта продолжает ухудшаться.

Термин «субъект», «пациент», «индивидуум» и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, которое поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект, пациент или индивидуум является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Терапевтически эффективным количеством» или «эффективным количеством» считается количество вводимого терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

## **Подробное описание изобретения**

### *Нуклеиновая кислота*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 (белок выживаемости моторных нейронов) с аминокислотной последовательностью  
MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDTALIKAYDKAVASFHALKNGDICETS  
GKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNNTAASLQQWVKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETCVVVY  
TGYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKSAPWNSF  
LPPPPMPGPRLLGPGKPLKFNGLPPPPPPPPHLLSCWLPPFSPGPIIPPPPPICPDSLDDADALGS  
MLISWYMSGYHTGYMGRQNKQKEGRCSHSLN (SEQ ID NO: 1), и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a.

В некоторых вариантах вышеуказанная нуклеиновая кислота используется для получения генотерапевтического вирусного препарата, который представляет собой экспрессионный вектор по изобретению или рекомбинантный вирус на основе AAV9 по изобретению.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты нуклеазы. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула

нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

Специалисту в данной области будет очевидно, что белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, включает нуклеотидную последовательность

ATGGCCATGAGCAGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACAGCGT  
GCTGTTCAAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGCCCTG  
ATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGACATCT  
GCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGA  
GCCAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGGAAGGTGGGCGACAAGTGCAGCG  
CCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAAGAGA  
GAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGCGACC  
TGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACGAGAA  
CGAGAGCCAAGTGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGCAACAAGAGCGA  
CAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCCCTGCCCCCTCCCCCCTATGCCCCG  
GCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCTCCTCCT  
CCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCAGCGGCCCTCCTATCATC  
CCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGACGATGCT  
GATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAAGACAGAACCAG  
AAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAC (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает микроРНК miR-23a, которая имеет нуклеотидную последовательность  
GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCCAGGG  
AUUCCAACCGACC (SEQ ID NO: 3).

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую микроРНК miR-23a, которая включает нуклеотидную последовательность

CATGCAAGTTGCTGTAGCCTCCTTGTCCCGCATGGGCCCTCTAGGTATCTCTGCCCTT  
CCAGTCCTGGGGCTGGAACGGAGGGCACAGCTAGGCTCCAGCTCCCCGTGTGGTGGCTCCTG  
CATATGAGAAAAGAGCTTCCCTGTGATCAAAGGAAGCATCTGGGGACCTGGAGGGGAGGTG  
TCCCCAATCTCATTACCTCCTTTGCTCTCTCTCTTTCTCCCCTCCAGGTGCCAGCCTCTGG  
CCCCGCCCGGTGCCCCCCTCACCCCTGTGCCACGGCCGGCTGGGGTTCTGGGGATGGGATT  
TGCTTCTGTACAAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCGACCCTGAGCTCTGCCACCGAG

GATGCTGCCCCGGGGACGGGGTGGCAGAGAGGCCCCGAAGCCTGTGCCTGGCCTGAGGAGCA  
GGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTCCACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCC  
CCCCAGGCCCTCACCTCCTCTGGCCTTGCCGCCTGTCCCCTGCTGCCGCCTGTCTGCCTGCCA  
TCCTGCTGCCTGGCCTCCCTGGGCTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTGGTT  
TGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACA (SEQ ID NO: 4).

Вышеуказанная нуклеиновая кислота, которая кодирует микроРНК miR-23a, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4 является нуклеиновой кислотой до процессинга.

После процессинга нуклеиновая кислота, которая кодирует микроРНК miR-23a, имеет нуклеотидную последовательность  
GGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCTTCCTGTCACAAATCACATTGCCAGGGATT  
TCCAACCGACC (SEQ ID NO:5).

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и

нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a.

*Экспрессионная кассета. Экспрессионный вектор.*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

Термин «экспрессионная кассета» при использовании в данном документе, в частности, относится к фрагменту ДНК, который способен в соответствующей обстановке запускать экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, который включен в указанную экспрессионную кассету. При введении в клетку-хозяина экспрессионная кассета помимо прочего способна задействовать клеточные механизмы для транскрипции полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, в РНК, которая затем обычно дополнительно процессируется и, наконец, транслируется в представляющий интерес полипептид. Экспрессионная кассета может содержаться в экспрессионном векторе.

Термин «кассета, которая экспрессирует» или «экспрессионная кассета» при использовании в данном документе, в частности, относится к фрагменту ДНК, который способен в соответствующей обстановке запускать экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, который включен в указанную экспрессионную кассету. При введении в клетку-хозяина экспрессионная кассета помимо прочего способна задействовать клеточные механизмы для транскрипции полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, в РНК, которая затем обычно дополнительно процессируется и, наконец, транслируется в представляющий интерес полипептид. Экспрессионная кассета может содержаться в экспрессионном векторе.

Экспрессионная кассета по настоящему изобретению содержит в качестве элемента промотор. Термин «промотор», используемый в настоящем документе, в частности, относится к элементу ДНК, который способствует транскрипции полинуклеотида, с которым функционально связан промотор. Промотор может также составлять часть элемента «промотор/энхансер». Хотя физические границы между элементами «промотор» и «энхансер» не всегда ясны, термин «промотор» обычно относится к месту на молекуле нуклеиновой кислоты, с которым связывается РНК-полимераза и/или связанные с ней факторы, и с которого инициируется транскрипция. Энхансеры усиливают активность промотора во времени, а также пространственно. В данной области известно множество промоторов, которые транскрипционно активны в широком диапазоне типов клеток. Промоторы могут быть разделены на два класса: на тех, которые функционируют конститутивно, и тех, которые регулируются индукцией или снятием репрессии. Для экспрессии белка пригодны оба класса. Промоторы, которые используются для продукции высокого уровня полипептидов в эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающих, должны быть сильными и, предпочтительно, должны быть активными в широком диапазоне типов клеток. Сильные конститутивные промоторы, которые способны запускать экспрессию во многих типах клеток, хорошо известны в данной области и, поэтому, нет необходимости в их подробном описании в данном документе. В соответствии с идеей настоящего изобретения предпочтительно использовать промотор цитомегаловируса (CMV). Промотор или промотор/энхансер, полученные из немедленной ранней (IE) области цитомегаловируса (hCMV) человека, в особенности подходят в качестве промотора в экспрессионной кассете по настоящему изобретению. Немедленная ранняя (IE) область цитомегаловируса (hCMV) человека и полученные из нее функциональные запускающие экспрессию фрагменты и/или функциональные усиливающие экспрессию фрагменты, например, описаны в EP0173177 и EP0323997, а также хорошо известны в данной области. Таким образом, несколько фрагментов немедленной ранней (IE) области hCMV могут использоваться в качестве промотора и/или промотора/энхансера. Согласно одному варианту осуществления изобретения промотор CMV человека используется в экспрессионной кассете по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотор;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотор (промотор вируса обезьяны 40);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;



aaataaatatctttatfttcattacatctgtgtgttggtttttgtgtgaatcgatagtaactaatacagctctccatcaaaacaaaacgaacaaaacaaactagc  
aaatagctgtccccagtgcaaGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах правый (второй) ITR имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:  
aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgctcgctcactgagggcgccgaccaaaggctgcccagcggcggcctttgccc  
cgggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с нуклеотидной последовательностью  
cctgcaggcagctgcgctcgctcgctcactgagggcgcccgggctgcccggcagctgagcgcgagcgcgcagaggggagtgccaactccatcactaggggttcctgcccgcacgcgtctagtattataatgaatcaattacggggcattgctcatagcccataatagg  
agttccggttacataacttacgtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacg  
Ccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacctcccacttggcagctacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctatt  
gacgtcaatgacgtaaatggcccgcctggcattatgccagctacatgacctatgggacttctacttggcagctacatctacgtattagtcatcgctattac  
catggtgatgcggtttggcagctacatcaatggcgctggatagcgggttactcacggggattccaagtctccacccttgacgtcaatgggagttgttt  
tgGcaccaaaatcaacgggactttcaaatgtcgtaacaactccgccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtggaggtctatataagc  
agagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggttc  
gaatccggcgccggaacggtgacgtggaacgcggttccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgctatagagtctataggcccacaaaaaatgcttt  
cttctttaataactttttgtttatcttatttcaataactttccctaactctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaata  
acagtgataattctgggttaaggcaatgcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagcta  
caatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctgattattctgagtcgaagctaggccctttgctaataatgctcctcttattctctcc  
cacagctcctgggcaacgtgctgtgtgtgctgcccacactttggcaagaattgggattcgaacCGATTGTAATTCATGAGCC  
ACCATGGCCATGAGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACAGCGTGC  
TGTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGCCCTGAT  
CAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGACATCTGC  
GAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGAGC  
CAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGGAAGGTGGGCGACAAGTGCAGCGCC  
ATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAAGAGAG  
AGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGCGACCT  
GCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACGAGAAC  
GAGAGCCAAGTGAGACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGCAACAAGAGCGAC  
AACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCCCTGCCCCCTCCCCCCTATGCCCGG  
CCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCTCCTCCTC  
CTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCAGCGGCCCTCCTATCATCC  
CTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCATGCTG  
ATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAACCAGA  
AGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAACTGATctagagtcgacctgcagaagcttgcctcgagcagcgtgctcgag  
agatctacgggtggcatccctgtgaccctccccagtgctctctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgcctaataaaattaagtt  
gcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtgtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtaggcctgc

ggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaaatcttggtcactgcaatctccgctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctccga  
gttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttgtagagacggggttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaate  
tcagtgatctaccacctggcctcccaattgctgggattacaggcgtgaaccactgtccctcctctcctctgattttgtagtaaacacTAGA  
GAAATGTTCTGGCACCTGCACttgactggggacagcctattttgctagttgtttgtttgtttgatggagagcgatgtagtac  
tatcattcacacaaaaaacacacacagatgtaataaaataagatattttattgcccgcTGTTCTGCTGAACTGAGCCAGT  
GTACACAAACCAACTGTGTTTCAGCTCAGTAGGCACGGGAGGCAGAGCCCAGGGAGGCCAG  
GCAGCAGGATGGCAGGCAGACAGGCGGCAGCAGGGGACAGGCGGCAAGGCCAGAGGAGGT  
GAGGGCCTGGGGGGCGGAACTTAGCCACTGTGAACACGACTTGGTGTGGACCCTGCTCACA  
AGCAGCTAAGCCCTGCTCCTCAGGCCAGGCACAGGCTTCGGGGCCTCTCTGCCACCCCGTCC  
CCGGGCAGCATCCTCGGTGGCAGAGCTCAGGGTCGGTTGAAATCCCTGGCAATGTGATTTG  
TGACAGGAAGCAAATCCCATCCCCAGGAACCCAGCCGGCCGTGGCACAGGGGTGAGGGGG  
GCACCCGGGCGGGGCCAGAGGCTGGCACCTGGAGGGGAGAAAGAGAGAGAGCAAAGGAG  
GTAATGAGATTTGGGGACACCTCCCCTCCAGGTCCCAGATGCTTCCTTTGATCACAGGGAA  
GCTCTTTTCTCATATGCAGGAGCCACCACACGGGGAGCTGGAGCCTAGCTGTGCCCTCCGTT  
CCAGCCCAGGACTGGAGAGGCAGAGATACCTAGAGGGCCCATGCGGGACAAGGAGGCTA  
CAGCAACTTGCAATGcccgcagcttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcactactctggaatagctcagaggccgaggcg  
gcctggcctctgcataaataaaaaaattagtcagcgatggggcggaatggggcggaactggggcgagttagggcgggatggggcgagtagg  
ggcggaCTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAGggcctccaagtacctccctacctaagtgcggaccgagcgcc  
gcaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccacaaaggtgccccgacccccggctttg  
ccccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgctcagg (SEQ ID NO: 6).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот или любую из вышеуказанных кассет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы» («вектор экспрессии» или «экспрессионный вектор»)).

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты,

вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать лидерный пептид (или сигнальный пептид), который облегчает выработку белка-интереса клеткой-хозяином. Ген белка-интереса может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца белка-интереса. Лидерным пептидом (или сигнальным пептидом) может быть лидерный пептид иммуноглобулина или иной лидерный пептид (то есть, лидерный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо генов SMN1 и микроРНК miR-23a по данному изобретению, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию гена SMN1 и гена микроРНК miR-23a в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

В контексте настоящего описания термин «промотор» или «регуляторная последовательность транскрипции» или «регуляторная последовательность» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен против направления считывания информации относительно направления транскрипции от сайта инициации транскрипции

кодирующей последовательности, а также который структурно идентифицируется по наличию сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и других последовательностей ДНК, включающих, без ограничения, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора белка, а также любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалистам в данной области, которые непосредственно или опосредованно регулируют уровень транскрипции с данным промотором. «Конститутивный» промотор представляет собой такой промотор, который активен в большинстве тканей в обычных физиологических условиях и условиях развития. «Индукцибельный» промотор представляет собой промотор, который подвергается физиологической регуляции или регуляции в ходе развития, например, при воздействии химического индуктора. «Тканеспецифичный» промотор активен только в конкретных типах тканей или клеток.

Термины «энхансеры» или «энхансер», используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт. Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой последовательности. Энхансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество энхансерных элементов.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие

которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

В одном из вариантов настоящего изобретения «экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему одну или несколько интересующих полинуклеотидных последовательностей, интересующих генов или «трансгенов», которые фланкированы парвовирусными или инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями (ITR).

Ни кассета, ни вектор по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, кодирующих неструктурные белки (Rep) и структурные белки (Cap) аденоассоциированного вируса.

#### *Рекомбинантный вирус на основе AAV9 (аденоассоциированный вирус 9 серотипа)*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу на основе AAV9 (аденоассоциированный вирус 9 серотипа) для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, который включает капсид и любую из вышеуказанных кассет.

Термин «рекомбинантный вирус на основе AAV» (или «вирусоподобная частица на основе AAV», или «рекомбинантный вирусный штамм AAV», или «рекомбинантный вектор AAV», или «вектор rAAV») в контексте настоящего описания относится к вышеуказанной экспрессионной кассете (или вышеуказанному экспрессионному вектору), которая заключена внутри капсида AAV.

Ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, p40. Молекулярная масса соответствующих белков (VP1, VP2 и VP3) составляет 87, 72 и 62 кДа, соответственно. Все три белка транслируются с одной мРНК. После транскрипции пре-мРНК может подвергаться сплайсингу двумя разными способами, при этом вырезается более длинный или более короткий интрон и образуются мРНК различной нуклеотидной длины.

При образовании рекомбинантного вируса на основе AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ИКП (ITR), упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, как было указано выше, не входят в кассету.

ДНК экспрессионной кассеты упакована в вирусный капсид в виде одноцепочечной молекулы ДНК (оцДНК) длиной приблизительно 3000 нуклеотидов. После инфицирования клетки вирусом, одноцепочечную ДНК конвертируют в форму двухцепочечной ДНК (дцДНК). Только дцДНК могут использовать белки клетки, которые транскрибируют содержащийся ген или гены в РНК.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV9, имеющий следующую аминокислотную последовательность MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTDGDTESVPDPQPI GEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRTWALPT YNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFPRKRLNF KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY YLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSW ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVA TESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPML GGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQY TSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV9, имеющий следующую аминокислотную последовательность: TAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTDGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMT MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTS GGSSNDNAYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDN NGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQN QQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNP GPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNH QSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGMKHPPPQI LIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVE FAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV9, имеющий следующую аминокислотную последовательность

MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTS  
GGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDN  
NGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRS  
SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQN  
QQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNP  
GPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNH  
QSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQI  
LIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVE  
FAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1, VP2 и VP3 AAV9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 с одной или несколькими точечными мутациями.

Под «несколькими точечными мутациями» подразумеваются две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять точечных замен.

Особенно предпочтительные варианты включают замены (мутации), которые являются консервативными по природе, т.е. те замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые объединены по их боковым цепям. В частности, аминокислоты обычно делят на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, достаточно обосновано предсказание о том, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет важного влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать вплоть до приблизительно 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, при условии, что желаемая функция молекулы остается незатронутой.

Вариант точечных мутаций в последовательностях белков VP1, VP2 или VP3 AAV9 с помощью аминокислотных замен представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в белке VP1, VP2 или VP3 AAV9 на другой аминокислотный остаток.

Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены».

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;  
CMV (цитомегаловирусный) промотер;  
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;  
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;  
сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и  
правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);  
CMV (цитомегаловирусный) энхансер;  
CMV (цитомегаловирусный) промотер;  
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;  
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;  
сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и  
правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);  
CMV (цитомегаловирусный) энхансер;  
CMV (цитомегаловирусный) промотер;  
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;  
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотор (промотор вируса обезьяны 40);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;  
сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и  
правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV9 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

#### *Фармацевтическая композиция*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для доставки гена SMN1 в целевые клетки, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Действующее вещество в вышеуказанной композиции находится в эффективном количестве, например, в биологически эффективном количестве.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирус на основе AAV9 по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе или в других фармацевтических агентах, адьювантах, разбавителях и т.д. Носитель для инъекций обычно является жидким. Носитель для других способов введения может быть или твердым, или жидким, таким как стерильная апиrogenная вода или стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буферный раствор. Для введения путем ингаляции носитель является вдыхаемым и предпочтительно находится в твердой или жидкой дисперсной форме. В качестве инъекционной среды предпочтительно использовать воду, содержащую добавки, общепринятые для инъекционных растворов, такие как стабилизирующие агенты, соли или солевые растворы и/или буферы.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV9 по изобретению и, по крайней мере, один

из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксипиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солюбилизаторы.

«Фармацевтически приемлемым» считается материал, который не имеет биологических или других противопоказаний, например, материал можно вводить субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно использовать, например, для трансфекции клетки *ex vivo* или для введения *in vivo* рекомбинантного вируса на основе AAV9 по изобретению непосредственно субъекту.

Термин «эксипиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату вектора на основе rAAV9, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8 °C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества

единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «единичная стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

### *Применение*

Авторы изобретения неожиданно установили, что miR-23a усиливает функциональное действие эффекта SMN1 *in vitro* и установили синергетический эффект SMN1 и miR-23a при лечении СМА в животной модели данной болезни.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для доставки гена SMN1 в целевые клетки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для выживаемости субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для обеспечения белком SMN1 субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции для лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу модуляции двигательной функции у субъекта с нарушением двигательных нейронов, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу обеспечения белком SMN субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки гена SMN1 в целевые клетки субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции в клетки субъекта.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV9 или вышеуказанной композиции субъекту со спинальной мышечной атрофией.

Под отсутствием полнофункциональных копий гена SMN1 подразумеваются инактивирующие мутации или делеции во всех копиях гена SMN1 в геноме, которые приводят к потере или дефекту функции гена SMN1.

Под субъектом подразумевают любое животное, которое поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Под субъектом, нуждающимся в доставке гена SMN1 в целевые клетки, или субъектом, нуждающимся в обеспечении белком SMN1, или субъектом, нуждающимся в доставке гена SMN1 в целевые клетки, подразумевается субъект, который имеет спинальную мышечную атрофию или субъект, который имеет инактивирующие мутации или делеции в гене SMN1, которые приводят к потере или дефекту функции гена SMN1.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, интраназальное, ингаляционное, чрезслизистое, трансдермальное, энтеральное (например, пероральное, ректальное), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное) введения, а также инъекции непосредственно в ткань или в орган.

Инъекционные препараты могут быть приготовлены в общепринятых лекарственных формах: в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для приготовления растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV9 по данному изобретению локально, а не системно, например, в виде депо или в композиции с замедленным высвобождением.

Рекомбинантный вирус на основе AAV9 вводят в организм в эффективном количестве. Рекомбинантный вирус на основе AAV9 предпочтительно вводят в организм в биологически эффективном количестве. «Биологически эффективное» количество рекомбинантного вируса представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать инфекцию (или трансдукцию) и экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты в клетке. Если вирус вводят в клетку *in vivo* (например, вирус вводят субъекту, как описано ниже), «биологически эффективное» количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать трансдукцию и экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени.

Дозировки вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV9 по данному изобретению будут зависеть от способа введения, конкретного вирусного вектора и их можно определять рутинными способами. Примерными дозами для достижения терапевтического эффекта являются вирусные титры, составляющие по меньшей мере примерно  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ ,  $10^{15}$ ,  $10^{16}$  трансдуцирующих единиц или больше,

предпочтительно приблизительно от  $10^9$  до  $10^{15}$  трансдуцирующих единиц, еще более предпочтительно  $10^{14}$  трансдуцирующих единиц на килограмм.

Клетка для введения вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV9 по изобретению может быть клеткой любого типа, включая в себя без ограничения, моторные нейроны или прочие ткани нервной системы, эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кожи, дыхательных путей и кишечника), печеночные клетки, мышечные клетки, клетки селезенки, фибробласты, эндотелиальные клетки и тому подобное.

Вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV9 по изобретению не используется для модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

### **Примеры**

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

### **Материалы и общие методы**

#### **Методы рекомбинантной ДНК**

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей. Вкратце, плазмидную ДНК нарабатывали для дальнейших манипуляций в клетках *E. coli*, выращиваемых под селективным давлением с антибиотиками для того, чтобы плазмиды не терялись в клеточной популяции. Плазмидную ДНК выделяли из клеток коммерческими наборами, измеряли концентрацию и использовали для клонирования с помощью обработки эндонуклеазами рестрикции или методами ПЦР-амплификации. Фрагменты ДНК лигировали между собой с помощью лигаз и трансформировали в бактериальные клетки для отбора клонов и дальнейших наработок. Все полученные генетические конструкции подтверждали по паттернам рестрикции и полным секвенированием по Сэнгеру.

#### **Синтез генов**

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 1000 п. н., которые фланкированы уникальными

сайтами рестрикции, собирали путем ренатурации олигонуклеотидов друг на друге с последующей ПЦР-амплификацией с крайних праймеров. В результате получали смесь фрагментов, включая нужный. Фрагменты клонировали по сайтам рестрикции в промежуточные векторы, после чего последовательности ДНК субклонированных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

### **Определение последовательностей ДНК**

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру. Анализ последовательностей ДНК и белков и обработку данных о последовательностях осуществляли в программе SnapGene 4.2 и выше для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

### **Культивирование клеточных культур**

В экспериментах были использованы клеточные линии НЕК293 (Human Embryonic Kidney clone 293) и U-87 MG (глиобластома человека). Клетки культивировались в стандартных условиях при 37°C и 5%CO<sub>2</sub>, на полной питательной среде DMEM с добавлением 10% FBS и антибиотика. Для культивирования HSMC культуральный пластик предварительно покрывался коллагеном (Gibco). Пересев клеток осуществлялся при достижении 80-90% конфлюентности. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью окраски Трупан Blue и камеры Горяева либо с помощью окраски PI и проточной цитометрии.

### **Транфекция клеток siRNA**

Коммерческую siRNA, специфичную к гену *SMN1*, вместе с неспецифичным контролем заказывали у производителя (ThermoFisher Scientific).

Клеточные линии засеивали накануне трансфекции в 6-луночные планшеты таким образом, чтобы они достигали 70-80% конфлюентности к моменту трансфекции. Трансфекцию осуществляли с помощью коммерческих наборов для липофекции по протоколу производителя. Через 24 ч после трансфекции осуществляли трансдукцию (см. ниже). Через 120 ч после трансдукции клетки обрабатывали растворами трипсина или аналогичными, снимали с подложки, отмывали в фосфатном буфере и собирали для дальнейшего анализа экспрессии целевых генов и белков. Для контроля уровня нокдауна белка SMN ставили иммуно-ферментный анализ (ИФА).

Все образцы ставили в трёх экспериментальных повторностях.

### **Анализ генной экспрессии**

Экспрессию *SMN1* на уровне мРНК, а также экспрессию *miR-23a* проверяли с помощью количественной ПЦР. Вкратце, использовали праймеры и пробу, специфичные к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SMN1. Для *miR-23a* использовали коммерческий набор для специфичной к процессированной *miR-23a* количественной ПЦР (Thermo Fisher Scientific). Для

контроля количества исходной РНК использовали праймеры и пробу, специфичные к гену домашнего хозяйства *GAPDH*. Для каждого набора праймеров и проб строили калибровочные кривые с применением известного количества копий линейризованной плазмидной ДНК, содержащей амплифицируемую последовательность соответствующего гена. Анализ экспрессии осуществляли, определяя по калибровочным кривым количество копий *SMN1* и *GAPDH* в каждом образце, после чего нормализовали количество копий *SMN1* на 10000 копий *GAPDH*. Полученные значения сравнивали между собой для различных образцов в рамках одного эксперимента.

### **Определение экспрессии белка SMN**

Для определения количества общего белка использовали набор Thermo Fisher Scientific. Клеточные осадки лизировали, полученные лизаты вносили в лунки микропланшета вместе со стандартными разведениями BSA с известной концентрацией. К образцам добавляли рабочий реагент, инкубировали. По окончании инкубации измеряли абсорбцию при длине волны 562 нм на микропланшетном ридере. Концентрацию общего белка в исследуемых образцах рассчитывали по кривой стандартного образца BSA. Далее, лизаты разводили до концентрации общего белка 10 мкг/мл.

Оценку содержания белка SMN в клетках проводили посредством иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора Abcam согласно инструкции производителя. В лунки микропланшета, покрытые антителами к SMN, вносили исследуемые образцы и стандарты с известной концентрацией. После инкубации и промывки, в каждую лунку добавляли специфичные к SMN поликлональные антитела для детекции, инкубировали, отмывали. Вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, инкубировали. Излишки реагентов смывали и добавляли TMB субстрат. После короткой инкубации ферментативную реакцию останавливали с помощью стоп-реагента. Оптическую плотность окрасившегося в желтый цвет продукта измеряли спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Количество SMN в исследуемых образцах определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации SMN в стандартах.

### **Определение экспрессии мишени SMN – белка Senataxin (функциональный тест)**

Белок Senataxin – полифункциональный фермент, участвующий в разрешении ДНК-РНК структур, называемых R-loops и возникающих в процессе транскрипции в отсутствие или при недостаточной экспрессии белка SMN. В литературе была показана прямая корреляция между уровнями экспрессии SMN и Senataxin, и непрямая активация Senataxin является одной из функций SMN. В связи с этим изменение экспрессии Senataxin было использовано в качестве функционального теста для SMN.

Уровень экспрессии Senataxin определяли с помощью метода Western blot. Вкратце, клетки лизировали буфером RIPA с добавлением коктейля ингибиторов протеаз после экспериментального воздействия (трансфекция, трансдукция, инкубация), получив образцы белковых лизатов. Образцы

наносили на 10% полиакриламидный денатурирующий гель, после чего осуществляли перенос белков на мембрану PVDF.

Мембрану инкубировали в течение 1 часа в растворе 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в буфере TBS-T, после чего раствор BSA заменяли на раствор 1% BSA в TBS-T с добавлением первичных антител, специфичных к Senataxin. Через 2 часа инкубации отмывали мембрану 3 раза раствором 1% BSA в TBS-T и добавляли раствор вторичных антител в TBS-T с 1% BSA. Использовали вторичные антитела, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена.

Вторичные антитела отмыли 3 раза раствором 1% BSA в TBS-T, после чего проявили белковый сигнал на мембране, используя субстрат для хемилюминисценции и систему визуализации гелей. Полученные изображения сохраняли в цифровом формате и анализировали интенсивность сигнала с помощью программного обеспечения системы визуализации гелей.

В качестве контроля для нормализации использовали белковый сигнал гена домашнего хозяйства винкулина. Окрашивание на него проводили аналогично.

### **Сборка и очистка вирусных частиц рекомбинантных векторов AAV**

Для сборки вирусных частиц AAV, содержащих ген *SMN1* или контрольный ген *GFP*, использовали упаковочные клетки HEK293, в которые трансфецировали с использованием полиэтиленimina 3 плазмиды:

1. Плазида, содержащая геном AAV с кассетой для экспрессии трансгена (*SNM1*, *GFP*, *SMN1 + miR-23a* или *GFP + miR-23a*);
2. Плазида для экспрессии гена *Cap* серотипа AAV9 и гена *Rep* серотипа AAV2. Каждый ген с помощью альтернативных рамок считывания кодирует несколько белковых продуктов;
3. Плазида для экспрессии генов аденовируса Ad5, необходимых для сборки и упаковки капсидов AAV.

Через 72 часа клетки лизировали и проводили очистку и концентрирование вирусных частиц с помощью методов фильтрации и хроматографии. Титр вирусных частиц определяли с помощью количественной ПЦР с праймерами и пробой, специфичными к участку рекомбинантного вирусного генома и выражали в виде количества копий вирусных геномов на 1 мл.

### **Трансдукция клеточных культур**

Клеточную линию U-87 засекали аналогично экспериментам для трансфекции, ставили трансфекцию с siRNA, после чего добавляли препарат с вирусными частицами и через 120 ч клетки анализировали. Эффективность трансдукции считали, анализируя процент GFP+ клеток.

Для используемых культур предварительно были поставлены эксперименты с проверкой эффективности трансдукции. Кратко, препарат вируса AAV9-GFP трансдуцировали в клеточные линии в различных соотношениях клеток и вирусных частиц. Отношение количества вирусных частиц и клеток называют multiplicity of infection (MOI). MOI вируса AAV9-GFP варьировали от

50000 до 1000000. В результате для линии U-87 была выбрана оптимальная MOI, равная 400000. Дальнейшие работы с трансдукцией U-87 проводили с такой MOI для всех вирусов.

После трансдукции анализ экспрессии генов и белков осуществляли как описано выше.

Все образцы ставили в трёх экспериментальных повторах.

### **Инъекция вирусных препаратов в мышиную модель спинальной мышечной атрофии (СМА)**

Вирусные частицы AAV9-SMN1, AAV9-GFP, AAV9-SMN1-miR-23a и AAV9-GFP-miR-23a использовали для инъекции в мышей модельной линии СМА. Данные мыши не экспрессируют ген *Smt* мыши, но имеют в своём геноме по одной копии гена *SMN2* человека и гена *SMN1* человека с отсутствующим 7 экзоном (*SMN1*Δ7). Без вмешательства или при инъекции плацебо такие мыши рождаются, но плохо набирают вес после рождения и погибают в среднем через 21 день.

Мышей модельной линии генотипировали в первый день после рождения, после чего мышей, не содержащих ни одной копии гена *Smt*, инъецировали системно (в хвостовую вену) либо плацебо (раствор, не содержащий вирусных частиц, но содержащий буфер для их разведения), либо одним из вирусов с дозой  $3,2 \times 10^{14}$  вг/кг веса. После этого содержали животных в стандартных условиях и ежедневно измеряли их вес, а также строили кривые выживаемости. Через 90 дней после инъекции выживших животных забивали для анализа тканей и прекращали эксперимент.

### **Пример 1. Сборка генетических конструкций, несущих рекомбинантный геном AAV и кодирующих гены *SMN1*, *GFP* и *miR-23a*.**

Последовательность гена *SMN1* была получена путём амплификации со специфическими праймерами с кДНК, синтезированной на основе тотальной РНК клеток НЕК293, либо собрана из серии олигонуклеотидов (см. выше). В процессе амплификации с 5'-конца гена была добавлена последовательность Kozak и сайт рестрикции *ClaI*, а с 3'-конца – сайт рестрикции *XbaI*. После этого последовательность гена *SMN1* была клонирована рестриктазно-лигазным методом по сайтам *ClaI* и *XbaI* в коммерческую конструкцию pAAV-GFP Control plasmid (VPK-402) от CellBiolab (США), с заменой гена *GFP* на *SMN1*, в результате была получена конструкция pAAV-SMN1.

В полученные ранее плазмиды pAAV-GFP и pAAV-SMN1 встроили дополнительную кассету для экспрессии *miR-23a*. Дополнительная кассета для экспрессии *miR-23a* состоит из промотора, гена интереса (*miR-23a*, получен с использованием ПЦР с геномной ДНК клеточной линии Huh7) и сигнала полиаденилирования. Целевые вектора были получены путем линейаризации по сайту *PmII* векторов-реципиентов (pAAV-GFP, pAAV-SMN1) и последующим встраиванием экспрессионной кассеты с *miR-23a* по липким концам.

Конечный вектор содержит все необходимые элементы для экспрессии гена и сборки в составе генома рекомбинантного AAV:

1. Терминальные повторы ITR на концах последовательности, которая инкапсидируется в вирусный капсид;

2. Кассету для экспрессии целевого гена (промотор, энхансер, интрон, последовательность Kozak, трансген, сайт полиаденилирования);
3. При наличии, кассету для экспрессии *miR-23a* (промотор, кассету микроРНК на основе *miR-30*, кодирующую прямую и обратную цепи *miR-23a*, сигнал полиаденилирования);
4. Ориджин бактериальной репликации и ген устойчивости к антибиотику для наработки плазмидной ДНК в бактериальных клетках.

### **Пример 2. Создание вирусных препаратов, экспрессирующих *SMN1* и *miR-23a***

Плазмиды pAAV-SMN1, pAAV-GFP, pAAV-SMN1-miR-23a, pAAV-GFP-miR-23a вместе с остальными плаزمидами, необходимыми для получения вирусных частиц рекомбинантного AAV (см. выше), были использованы для биопроцесса получения AAV. В качестве серотипа использовали серотип AAV9 дикого типа или с различными мутациями. Во всех случаях сравнение свойств вирусных частиц проводили только в случае идентичности используемого серотипа и мутаций капсида, если они присутствовали. Все серотипы на базе AAV9, дикого типа или с мутациями, в дальнейшем обозначаются как AAV9 без указания мутаций.

В результате биопроцесса были получены рекомбинантные вирусные частицы, обозначенные как AAV9-SMN1, AAV9-GFP, AAV9-SMN1-miR-23a, AAV9-GFP-miR-23a. После определения титров вирусных частиц, все 3 препарата с одинаковыми MOI равными 400 тысяч были использованы для трансдукции пермиссивных клеток – U-87, предварительно (за 24 ч до этого) трансфицированных siRNA против SMN1 или siRNA с неспецифической последовательностью. Дальнейший анализ проводили только в том случае, если эффективность трансдукции GFP составляла не менее 70%.

После успешной трансдукции клетки снимали с подложки, отмывали в фосфатном буфере и анализировали экспрессию *SMN1* на уровне мРНК и белка SMN как описано выше. Было показано, что при трансдукции вирусами AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a экспрессия *SMN1* превышала эндогенный уровень по мРНК (табл. 1, фиг. 1) и восстанавливалась до эндогенного уровня (наблюдаемого в контроле без siRNA, специфичной к *SMN1*) на уровне белка (табл. 2, фиг. 2).

Таблица 1.

Название образца	Среднее значение количества копий мРНК, нормированное на копии GAPDH	Стандартное отклонение
Без siRNA, без вируса	0,00275	0,00021
siNeg	0,00168	0,00009
siSMN1	0,0002	0,00002
siNeg + AAV9-GFP	0,00203	0,00033
siSMN1 + AAV9-GFP	0,00039	0,00006
siNeg + AAV9-GFP-miR-23a	0,00185	0,00028
siSMN1 + AAV9-GFP-miR-23a	0,00039	0,00001
siNeg + AAV9-SMN1	0,10363	0,01045
siSMN1 + AAV9-SMN1	0,33121	0,01495
siNeg + AAV9-SMN1-miR-23a	0,24863	0,01715
siSMN1 + AAV9-SMN1-miR-23a	0,34258	0,0705

Таблица 2.

Название образца	Среднее значение количества SMN (пг), нормированного на тотальный белок (мкг)	Стандартное отклонение
Без siRNA, без вируса	83,37	8,58
siNeg	73,43	5,53
siSMN1	5,45	1,36
siNeg + AAV9-GFP	67,95	12,41
siSMN1 + AAV9-GFP	5,4	1,02
siNeg + AAV9-GFP-miR-23a	71,82	3,16
siSMN1 + AAV9-GFP-miR-23a	4,8	1,23
siNeg + AAV9-SMN1	116,4	1,85
siSMN1 + AAV9-SMN1	69,15	5,71
siNeg + AAV9-SMN1-miR-23a	99,95	7,1
siSMN1 + AAV9-SMN1-miR-23a	91,13	4,93

Также, был определён уровень экспрессии *miR-23a* в образцах после трансдукции. Было показано значительное превышение экспрессии *miR-23a* в образцах, трансдуцированных вирусами AAV9-SMN1-*miR-23a*, AAV9-GFP-*miR-23a*. В остальных образцах экспрессия *miR-23a* не отличалась от эндогенной. Трансфекция siRNA против *SMN1* не влияла на экспрессию *miR-23a* (табл. 3, фиг. 3).

Таблица 3.

Название образца	Среднее значение нормализованного количества <i>miR-23a</i> (%)	Стандартное отклонение
Без siRNA, без вируса	100	12
siNeg	95	10
siSMN1	113	13
siNeg + AAV9-GFP	124	12,41
siSMN1 + AAV9-GFP	107	11
siNeg + AAV9-GFP- <i>miR-23a</i>	843	33
siSMN1 + AAV9-GFP- <i>miR-23a</i>	768	26
siNeg + AAV9-SMN1	116,4	16
siSMN1 + AAV9-SMN1	77	8
siNeg + AAV9-SMN1- <i>miR-23a</i>	803	15
siSMN1 + AAV9-SMN1- <i>miR-23a</i>	920	19

Отметим, что изменение экспрессии *SMN1* при нокдауне или восстановлении с помощью вирусного препарата не влияло на экспрессию *miR-23a*. Также, гиперэкспрессия *miR-23a* не оказывала влияния на экспрессию *SMN1*.

### Пример 3. Функциональная оценка *SMN1* и *miR-23a in vitro* после трансдукции

Описанная выше схема эксперимента по нокдауну *SMN1* и восстановлению его экспрессии с помощью трансдукции вирусными частицами была использована для оценки функциональной кооперации *SMN1* и *miR-23a in vitro*. Среди множества функций *SMN1*, данный белок ответственен за правильное разрешение ДНК-РНК дуплексов, возникающих в процессе транскрипции. При этом основным белком, участвующим в разрешении дуплексов, является Senataxin, который, по литературным данным, непрямым образом активируется *SMN*. Таким образом, можно считать активацию Senataxin функциональным тестом активности *SMN* в клетках.

Уровень экспрессии Senataxin в образцах определяли с помощью метода Western blot. Было обнаружено, что при нокдауне экспрессии *SMN* экспрессия Senataxin также снижалась примерно в 2 раза, а при восстановлении экспрессии *SMN* вирусом AAV9-*SMN1* возвращалась на эндогенный уровень. При трансдукции контрольным вирусом AAV9-GFP-*miR-23a* также наблюдалась тенденция к незначительному увеличению экспрессии Senataxin в случае нокдауна *SMN*, однако оно не было статистически достоверным. Важно отметить, что при трансдукции вирусом AAV9-*SMN1-miR-23a* экспрессия Senataxin не только восстанавливалась до эндогенного уровня на фоне нокдауна эндогенного *SMN*, но и увеличивалась статистически достоверно в 1,5 – 2 раза (табл. 4, фиг. 4).

Таблица 4.

Название образца	Среднее значение нормализованного количества Senataxin (%)	Стандартное отклонение
Без siRNA, без вируса	100	15
siNeg	109	17
siSMN1	46	8
siNeg + AAV9-GFP	115	11
siSMN1 + AAV9-GFP	53	12
siNeg + AAV9-GFP- <i>miR-23a</i>	98	14
siSMN1 + AAV9-GFP- <i>miR-23a</i>	73	19
siNeg + AAV9- <i>SMN1</i>	124	21
siSMN1 + AAV9- <i>SMN1</i>	110	13
siNeg + AAV9- <i>SMN1-miR-23a</i>	196	17
siSMN1 + AAV9- <i>SMN1-miR-23a</i>	168	7

Это свидетельствует о наличии синергетического эффекта SMN и *miR-23a* на экспрессию Senataxin, превышающего эффект как *miR-23a*, так и SMN по отдельности на регуляцию данного гена.

#### **Пример 4. Синергетический эффект *SMN1* и *miR-23a* при лечении животных мышинной модели СМА**

Вирусные препараты AAV9-SMN1 и AAV9-SMN1-miR-23a инъецировали в хвостовую вену модельных мышей СМА в первый день после рождения с дозой  $3,6 \times 10^{14}$  вг/кг. В качестве контролей использовали раствор без вирусных частиц (плацебо) и группу мышей-сиблингов дикого типа, не имевших фенотипа СМА в силу экспрессии у них *Smn*. Далее строили функции выживаемости мышей во всех группах. По достижении момента, когда было возможно определить медианы времени выживания для всех групп, медианы были посчитаны.

Наибольшим образом фенотип СМА был исправлен в группе, инъецированной вирусом AAV9-SMN1-miR-23a. Медиана времени выживания для группы составила 55 дней. Этот результат значительно отличался от группы, инъецированной вирусом AAV9-SMN1, где медиана времени выживания составила 21 день. Для мышей, инъецированных плацебо, медиана составила 16 дней после рождения (фиг. 5). Данный результат свидетельствует о наличии синергетического эффекта *SMN1* и *miR-23a* при лечении СМА в животной модели данной болезни.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**SEQ ID NO: 1 - Аминокислотная последовательность белка SMN1**

**PRT**

**природная**

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDTALIKAYDKAVASFKHALKNGD  
ICETSGPKKTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETC  
VVVYTG YGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKSA  
PWNSFLPPPPMPGPRLGPGKPLKFNGLPPPPPPPPHLLSCWLPPFSPGPIIPPPPICPDSLDDA  
DALGSMLISWYMSGYHTGYMGRQNRQKEGRCSHSLN

**SEQ ID NO: 2 - последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок SMN1**

**DNA**

**Искусственная**

ATGGCCATGAGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACAGCGT  
GCTGTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGCCCTG  
ATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGACATCT  
GCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGA  
GCCAGAAGAAGAACACCGCCCGCCAGCCTGCAGCAGTGGAAAGGTGGGCGACAAGTGCAGCG  
CCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAAGAGA  
GAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGCGACC  
TGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACGAGAA  
CGAGAGCCAAGTGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGCAACAAGAGCGA  
CAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCTGCCCCCTCCCCCCCCTATGCCCCG  
GCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCCCCTCCTCCT  
CCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCCAGCGGCCCTCCTATCATC  
CCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCATGCT  
GATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAACCAG  
AAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAC

**SEQ ID NO: 3 - микроРНК miR-23a**

**RNA**

**Искусственная**

GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCC  
AGGGAAUUCCAACCGACC

**SEQ ID NO: 4 - последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует микроРНК miR-23a (до процессинга)**

**DNA**

**Искусственная**

CATGCAAGTTGCTGTAGCCTCCTTGTCCCGCATGGGCCCTCTAGGTATCTCTGCCTCT  
CCAGTCCTGGGGCTGGAACGGAGGGCACAGCTAGGCTCCAGCTCCCCGTGTGGTGGCTCCTG  
CATATGAGAAAAGAGCTTCCCTGTGATCAAAGGAAGCATCTGGGGACCTGGAGGGGAGGTG  
TCCCCAAATCTCATTACCTCCTTTGCTCTCTCTCTTTCTCCCTCCAGGTGCCAGCCTCTGG  
CCCCGCCCGGTGCCCCCTCACCCCTGTGCCACGGCCGGCTGGGGTTCTGGGGATGGGATT  
TGCTTCCTGTCACAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCGACCCTGAGCTCTGCCACCGAG  
GATGCTGCCCCGGGGACGGGGTGGCAGAGAGGCCCCGAAGCCTGTGCCTGGCCTGAGGAGCA  
GGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTCCACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCC  
CCCCAGGCCCTCACCTCCTCTGGCCTTGCCGCCTGTCCCCTGCTGCCGCCTGTCTGCCTGCCA  
TCCTGCTGCCTGGCCTCCCTGGGCTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTGGTT  
TGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACA

**SEQ ID NO: 5 - последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует микроРНК miR-23a (после процессинга)**

**DNA**

**Искусственная**

GGCCGGCTGGGGTTCTGGGGATGGGATTTGCTTCCTGTCACAAATCACATTGCCAG  
GGATTTCCAACCGACC

**SEQ ID NO: 6 – последовательность нуклеиновой кислоты экспрессионной кассеты (полная)**

**DNA**

**Искусственная**

cttcagcagctgcgcgctcgctcactgagccgcccggcgctggcgacctttggtgcccggcctcagtgagcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggttcctgcgccgcacgcgtctagtattaatagtaataattacggggtcattagttcatagccc

atataaggagttccgctfacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccat  
agtaacgCcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgc  
cccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagcatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcate  
gctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatggg  
agtttttttGcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtct  
ataaagcagagctcgttttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccg  
cggattcgaatcccggccgggaacgggtgattggaacgcggttccccgtccaagagtacgtaagtaccgctatagagtctataggcccacaaaa  
aatgctttctcttttaataactttttgttatcttatttctaatactttcccaatctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattcta  
aagaataacagtgataattctgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaatattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaata  
gcagctacaatccagctaccattctctttttttatggttgggataaggctggattattctgagccaagctagggcccttttctaatacatgttcatacctcttat  
ctctctccacagctcctgggcaacgtgctgctgtgtgtgctggcccactttggcaaagaattgggattcgaacatCGATTGTAATTCAT  
GAGCCACCATGGCCATGAGCAGCGGGCGGCAGCGGGCGGCGGTGCCTGAGCAAGAGGACA  
GCGTGCTGTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGC  
CCTGATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGAC  
ATCTGCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAAC  
AAGAGCCAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGAAGGTGGGCGACAAGTGC  
AGCGCCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAA  
GAGAGAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGC  
GACCTGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACG  
AGAACGAGAGCCAAGTGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAAGCCCGGCAACAAGA  
GCGACAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCTGCCCCCTCCCCCCCCTATG  
CCCGGCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCCCCTCC  
TCCTCCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCAGCGGCCCTCCTAT  
CATCCCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCA  
TGCTGATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAAC  
CAGAAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAGTGA Tctagagtcgacctgcagaagcttgctcagcagcgcgt  
gctcgagagatctacgggtggcatccctgtgacccctcccagtcctctctggccctggaagttgccactccagtgccaccagccttgcctaataaa  
attaagttgcatctttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtag  
ggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgctcctgggtcaagcgattctcctgcctcagc  
ctcccagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatTTTTTTTTTgtagagacggggttccacatattggccaggctggtctcaac  
tctaactcaggtgatctaccaccttggcctccaaattgtgggattacaggcgtgaaccactgctccttccctgtcctctgattttgtaggtaaccac  
TAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACttgactggggacagcctattttgtagttttgtttttttttgatggagagcgtatg  
ttagtactatcattcacacaaaaaccaacacacagatgtaataaaataagatattttattgcccgcTGTTCCCTGCTGAACTGAGC  
CAGTGTAACAAACCAACTGTGTTTCAGCTCAGTAGGCACGGGAGGCAGAGCCCAGGGAGG  
CCAGGCAGCAGGATGGCAGGCAGACAGGCGGCAGCAGGGGACAGGCGGCAAGGCCAGAGG  
AGGTGAGGGCCTGGGGGGCGGAACTTAGCCACTGTGAACACGACTTGGTGTGGACCCTGCT  
CACAAGCAGCTAAGCCCTGCTCCTCAGGCCAGGCACAGGCTTCGGGGCCTCTCTGCCACCCC  
GTCCCCGGGCAGCATCCTCGGTGGCAGAGCTCAGGGTTCGGTTGGAAATCCCTGGCAATGTGA

TTTGTGACAGGAAGCAAATCCCATCCCCAGGAACCCCAGCCGGCCGTGGCACAGGGGTGAG  
GGGGGCACCGGGCGGGGCCAGAGGCTGGCACCTGGAGGGGAGAAAGAGAGAGAGAGAAA  
GGAGGTAATGAGATTTGGGGACACCTCCCCTCCAGGTCCCCAGATGCTTCCTTTGATCACAG  
GGAAGCTCTTTTCTCATATGCAGGAGCCACCACACGGGGAGCTGGAGCCTAGCTGTGCCCTC  
CGTTCCAGCCCCAGGACTGGAGAGGCAGAGATACCTAGAGGGGCCATGCGGGACAAGGAGG  
CTACAGCAACTTGCATGgccgcagcttttgcaaaagcctagggcctcaaaaaagcctcctcactactctggaatagctcagaggccga  
ggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagcgtggggcggaatgggcggaactgggcgagftagggcgggatgggcgagtg  
tagggcggggaCTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAgggcccctcaagtacctcccgtaccttaagtgcggaccgagcg  
gcccaggaaccctagtgtgaggtggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaaggtgcgccgagcccgggc  
ttgccccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagg

**SEQ ID NO: 7 – Аминокислотная последовательность белка VP1 AAV9**

**PRT**

**природная**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPN  
GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVF  
QAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVP  
DPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRT  
WALPTYNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGF  
PKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVMI  
PQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSLDRMLNP  
LIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFA  
WPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEI  
KTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGN  
FHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS  
KRWNPEIQYTSNYYKSNVFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

**SEQ ID NO: 8 – Аминокислотная последовательность белка VP2 AAV9**

**PRT**

**природная**

TAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGV  
GSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS  
NSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGF  
PKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVMI  
PQYGYLTLNDGSQAV

GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSG  
QNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLM  
NPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVAT  
NHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPP  
PQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNN  
VEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

**SEQ ID NO: 9 – Аминокислотная последовательность белка VP3 AAV9**

**PRT**

**природная**

MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQ  
ISNSTSGGSSNDNA YFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKE  
VTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQA  
VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGS  
GQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSL  
MNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVA  
TNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHP  
PPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNN  
NVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

**SEQ ID NO: 10 - левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы)**

**DNA**

**природная**

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcactgaggccgcccggcgctggcgaccttggctgcccggcctcagtgagcgagcgagc  
gcgagagaggagtgccaactccatcactaggggttct

**SEQ ID NO: 11 - CMV (Цитомегаловирусный) энхансер**

**DNA**

**природная**

cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaac  
gCcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaactgccactggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacccccctat  
tgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctatta  
ccatg

**SEQ ID NO: 12 - CMV (Цитомегаловирусный) промотер**

**DNA**

**природная**

gtgatgcggttttggcagtacatcaatggcggtgatagcggttgactcacggggattccaagtctccaccattgacgtcaatgggagtt  
tgttttGcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctgtaaacactcccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatat  
aagcagagct

**SEQ ID NO: 13- интрон гена hBG1 (Субъединица гемоглобина гамма-1)**

**DNA**

**природная**

cgaatcccggccgggaacgggtgcatfccaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgctatagatctataggcccaaa  
aaaatgctttctctttaataatactttttgttatcttatttctaatactttccctaactctcttttccagggaataatgatacaatgatcatgcctctttgaccatt  
ctaaagaataacagtgataattctgggttaaggcaatagcaatattctgcatataaatattctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgcta  
atagcagctacaatccagctaccattctctttatattatggtgggataaggctgattattctgagccaagctaggcccttttctaatacatgttcatactc  
ttatctctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgctgcccacactttggcaagaattgggat

**SEQ ID NO: 14- сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования (поли(A))  
гормона роста человека)**

**DNA**

**природная**

acgggtggcatccctgtgacctccccagtgctctctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgcctaataaaattaa  
gttgcacattttgtctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaagggcaagttgggaagacaacctgtagggcc  
tgccgggtctattgggaaccaagctggagtgcaagtgccacaatctggctcactgcaatctccgctctgggtcaagcattctctgcctcagcctcc  
cgagttgtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttggtagagacggggttcacatattggccaggtggtctccaactcct  
aatctcaggtgatctaccacctggcctcccaaatgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgctctt

**SEQ ID NO: 15 - SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);**

**DNA**

**Природная**

TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGtcccgccctaactccgccatccccccctaactccgccagttccgc  
ccattctccgcccatcgctgactaattttttattatgcagaggccgagggccctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggag  
gcctaggctttgcaaaaagct

**SEQ ID NO: 16 - сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования  
вируса обезьяны 40)**

**DNA**

**Природная**

aataaaaatctttatfttcattacatctgtgtgttggtttttgtgtgaatcgatagtagtaacatacgtctccatcaaaaacaaaacgaacaac  
aaactagcaaaaataggctgtccccagtcaaGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT

**SEQ ID NO: 17 - правый (второй) ITR**

**DNA**

**природная**

### Формула изобретения:

1. Выделенная нуклеиновая кислота для получения генотерапевтического вирусного препарата, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 (белок выживаемости моторных нейронов) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, где нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, где микроРНК miR-23a имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

4. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, где нуклеиновая кислота, которая кодирует микроРНК miR-23a, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Экспрессионная кассета, которая включает нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-4.

6. Экспрессионная кассета по п. 5, включающая следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;

сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и

правый (второй) ITR.

7. Экспрессионная кассета по п.6, которая включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

8. Экспрессионный вектор, который включает нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-4 или кассету по любому из пп. 5-7.

9. Рекомбинантный вирус на основе AAV9 (аденоассоциированный вирус 9 серотипа) для экспрессии гена SMN1 в целевых клетках, который включает капсид и экспрессионную кассету по любому из пп. 5-7.

10. Рекомбинантный вирус на основе AAV9 по п. 9, где капсид включает белок VP1 AAV9.

11. Рекомбинантный вирус на основе AAV9 по п. 10, где капсид включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

12. Рекombинантный вирус на основе AAV9 по п.10, где капсид включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями.

13. Рекombинантный вирус на основе AAV9 по пп. 9-12, где капсид включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);  
CMV (цитомегаловирусный) энхансер;  
CMV (цитомегаловирусный) промотер;  
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок SMN1;  
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);  
SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);  
нуклеиновую кислоту, которая кодирует микроРНК miR-23a;  
сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40) и  
правый (второй) ITR.

14. Рекombинантный вирус на основе AAV9 по п. 10, где капсид включает белок VP1 AAV9, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 6.

15. Фармацевтическая композиция для доставки гена SMN1 в целевые клетки, включающая рекombинантный вирус на основе AAV9 по пп. 9-14 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

16. Применение рекombинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 для доставки гена SMN1 в целевые клетки.

17. Применение рекombинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 для выживаемости субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

18. Применение рекombинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 для обеспечения белком SMN1 субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию и/или не имеет полнофункциональных копий гена SMN1.

19. Применение рекombинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 для лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию.

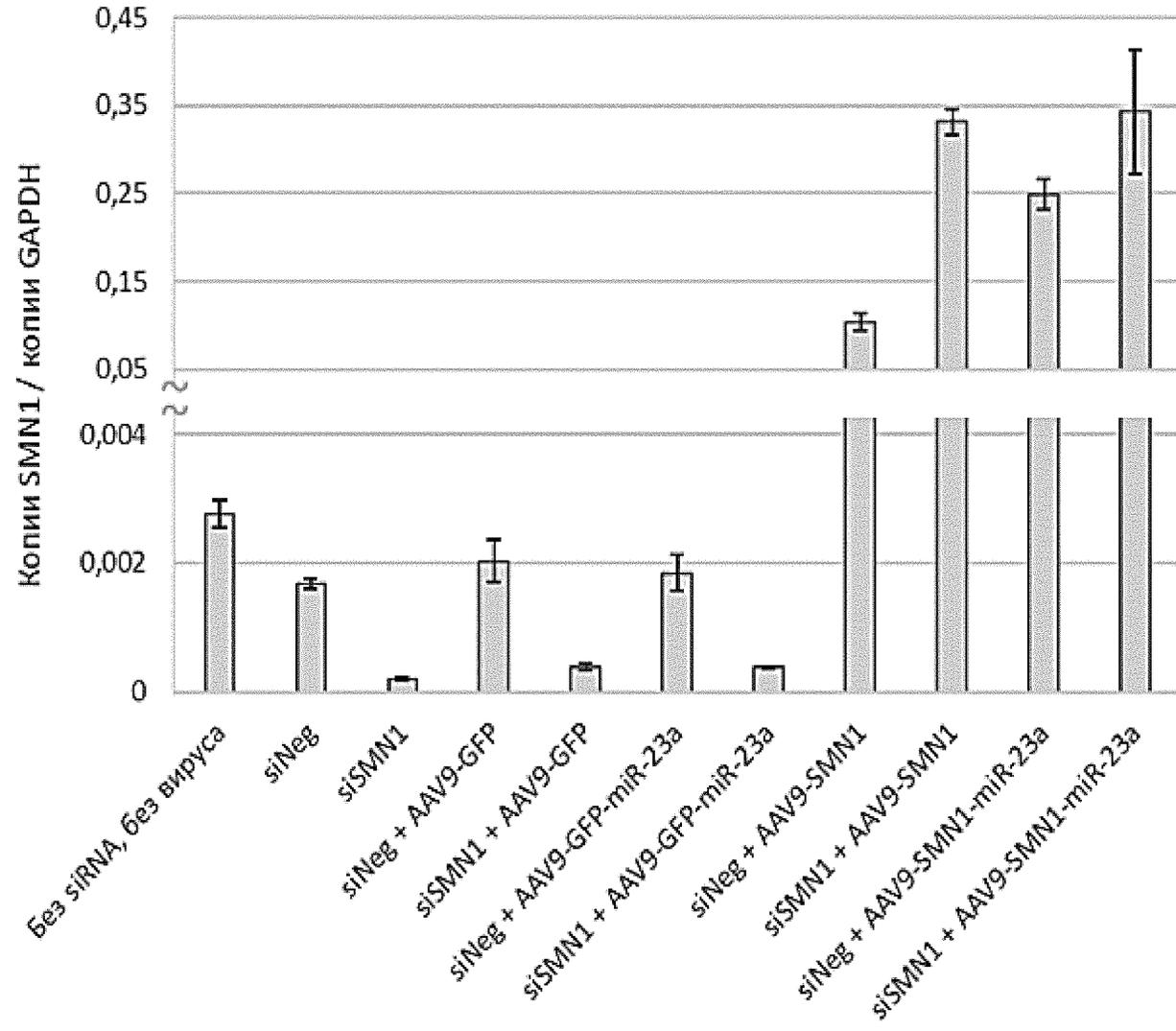
20. Способ модуляции двигательной функции у субъекта с нарушением двигательных нейронов, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 в клетки субъекта.

21. Способ обеспечения белком SMN субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

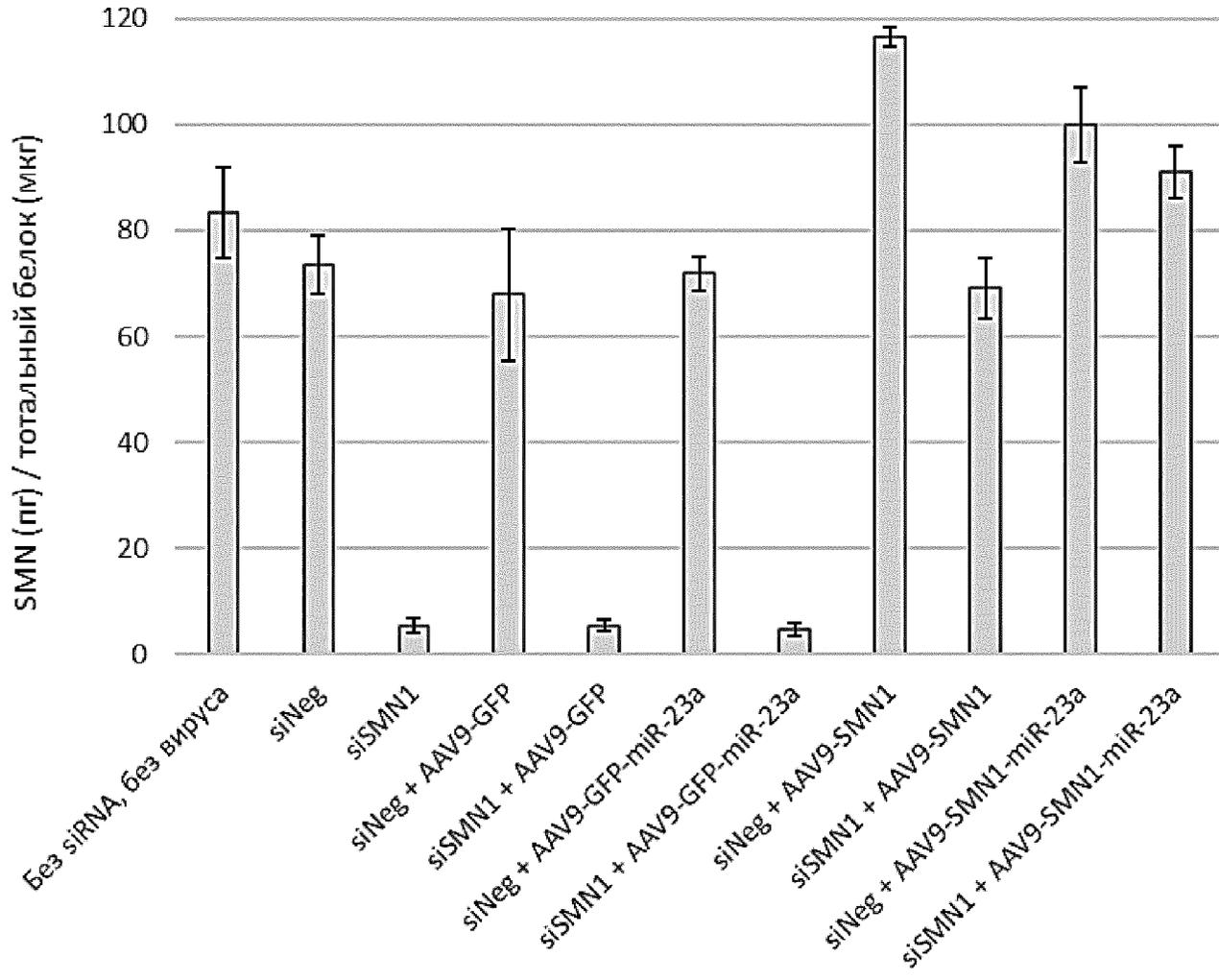
22. Способ доставки гена SMN1 в целевые клетки субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 в клетки субъекта.

23. Способ лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который включает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп. 9-14 или композиции по п. 15 субъекту со спинальной мышечной атрофией.

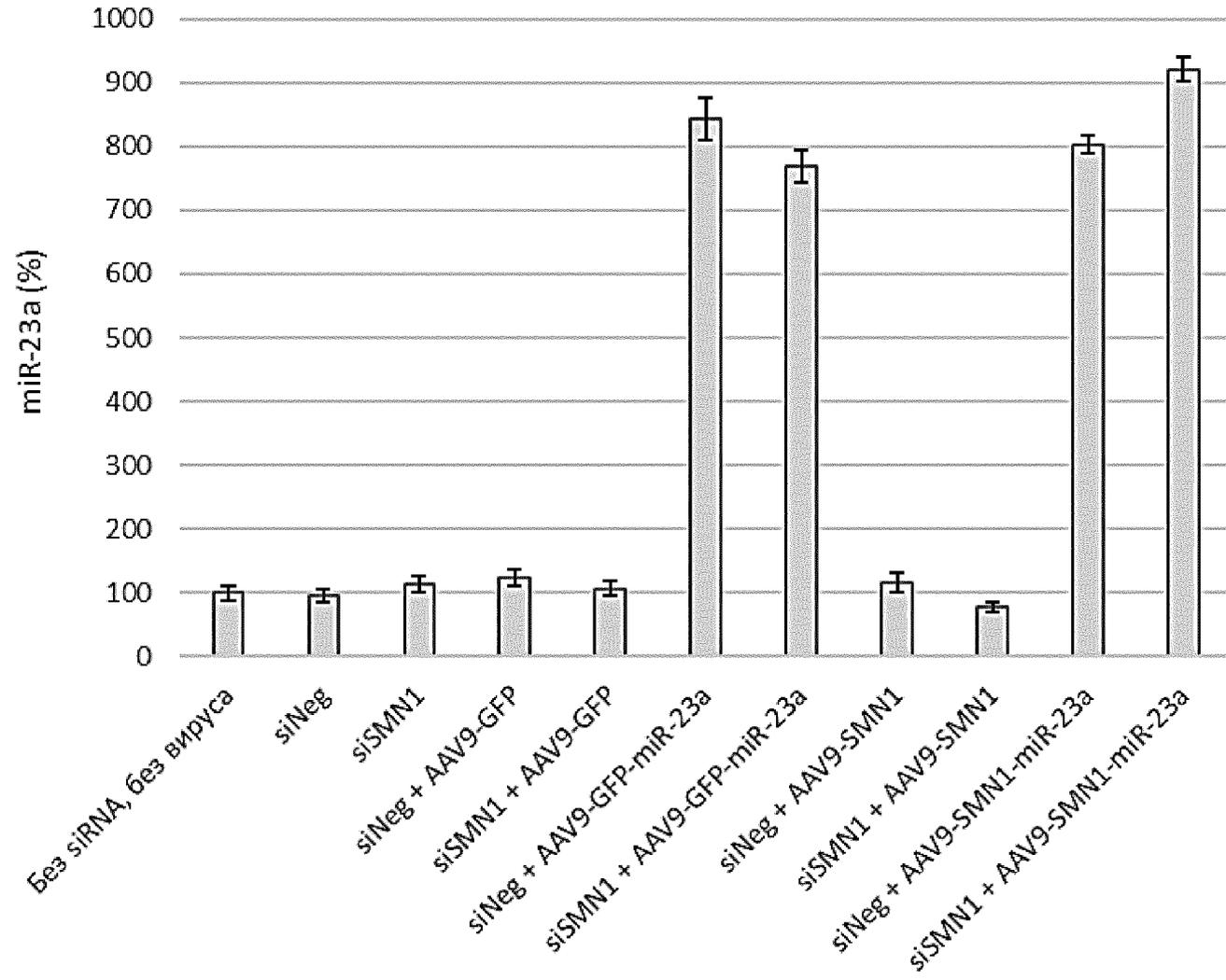
Фиг. 1



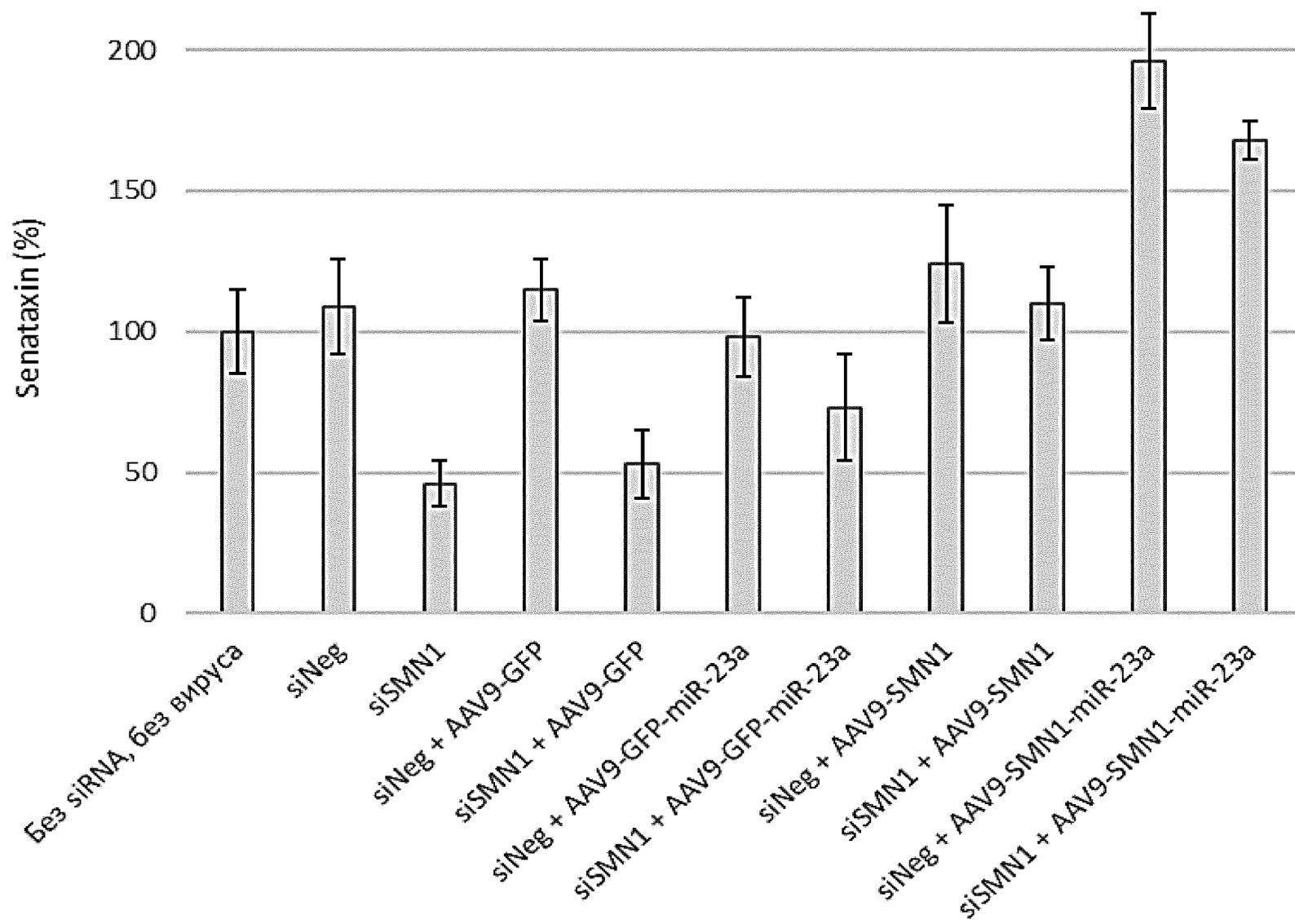
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

