

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047326**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.04

(21) Номер заявки
202391800

(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**

(43) **2023.10.24**

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

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

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**

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

(56) WO-A1-2017136536
Sequence Q16637-1. Posted 01.11.1996,
[online]. Retrieved 25.05.2022. Retrieved from
<UniProtKB database>
DOMINGUEZ E. et al. Intravenous scAAV9
delivery of a codon-optimized SMN1 sequence
rescues SMA mice. Human molecular genetics, 2011,
V. 20, N. 4, page 682
WO-A1-2010129021

(57) Настоящее 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.

B1

047326

047326

B1

Область техники

Настоящее 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 (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 WO 2017106354 (A1), WO 2010129021 (A1), WO 2015060722 (A1), WO 2017066579 (A1), WO 2015158749 (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 ами-

нокислотной 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:

нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и

нуклеиновая кислота, 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);

нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;

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

SV40 промотор (промотор вируса обезьяны 40);

нуклеиновая кислота, 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);

нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;

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

SV40 промотор (промотор вируса обезьяны 40);

нуклеиновая кислота, 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

Фиг. 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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%.

Фиг. 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 фиг. 1-4:

siNEG это негативный контроль siRNA,

siSMN1 это siRNA для SMN1.

Фиг. 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 помета, 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 данно-

го 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 шпилечную структуру. Такие шпилечные 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 нессплайсированная 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

MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDTALIKAYDKAVASFKHALKNGDICETS
GPKKTPKRKPAKKNSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDCIYPATIASIDFKRETQVVVY
TGYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKSAPWNSF
LPPPPMPGPRLLGPGKPLKFNPPPPPPPHLLSCWLPPFSPGPPPIPPPPPCPDSLDDADALGS
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

ATGGCCATGAGCAGCGGGCGGCGAGCGGGCGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACAGCGT
GCTGTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGCCCTG
ATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGACATCT
GCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCAAGAAGAACAAGA
GCCAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGAAGGTGGGCGACAAGTGCAGCG
CCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAAGAGA
GAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGCGACC
TGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACGAGAA
CGAGAGCCAAGTGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGAACAAGAGCGA
CAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCCCTGCCCTCCCCCTATGCCCG
GCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCTCCTCCT
CCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCTTCCCCAGCGGCCCTCCTATCATC
CCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCATGCT
GATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAACCAG
AAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAC (SEQ ID NO: 2).

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

GGCCGCGUGGGGUUCCUGGGGAUUGGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCCAGGG
AUUCCAACCGACC (SEQ ID NO: 3).

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

gggtctattggaaccaagctggagtcagtgccacaatcttgctcactgcaatctccgcctcctgggtcaagcgattctctcctcagcctcccga
gtttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttgtagagacggggttcaccafattggccaggctgctccaactcctaate
tcaggtgatctaccaccttgctcccaaatgctgggattacagcgctgaaccactgctccctccctgctctctgattttgtagtaaccacTAGA
GAAATGTTCTGGCACCTGCACtgcactggggacagcctattttgctagttgtttgtttctttttgatggagagcgtatgttagtac
tatcattcacacaaaaaacacacacagatgtaataaaataagatattttatgcgccgcTGTTCCCTGCTGAACTGAGCCAGT
GTACACAAACCAACTGTGTTTCAGCTCAGTAGGCACGGGAGGCAGAGCCCAGGGAGGCCAG
GCAGCAGGATGGCAGGCAGACAGGCCGACAGGGGACAGGCCGCAAGGCCAGAGGAGGT
GAGGGCCTGGGGGGCGGAACTTAGCCACTGTGAACACGACTTGGTGTGGACCCTGCTCACA
AGCAGCTAAGCCCTGCTCCTCAGGCCAGGCACAGGCTTCGGGGCCTCTCTGCCACCCCGTCC
CCGGGCAGCATCCTCGGTGGCAGAGCTCAGGGTCGGTTGAAAATCCCTGGCAATGTGATTTG
TGACAGGAAGCAAATCCCATCCCCAGGAACCCAGCCGGCCGTGGCACAGGGGTGAGGGGG
GCACCGGGCGGGCCAGAGGCTGGCACCTGGAGGGGAGAAAGAGAGAGAGAGCAAAGGAG
GTAATGAGATTTGGGGACACCTCCCTCCAGGTCCCCAGATGCTTCCTTTGATCACAGGGAA
GCTCTTTTCTCATATGCAGGAGCCACCACACGGGGAGCTGGAGCCTAGCTGTGCCCTCCGTT
CCAGCCCCAGGACTGGAGAGGCAGAGATACCTAGAGGGCCATGCGGGACAAGGAGGCTA
CAGCAACTTGCATGgcccagctttttgcaaaagcctaggcctcaaaaagcctcctcactactctggaatagctcagaggccgagcg
gcctcgctctgcataataaaaaaattagtcagcgatggggcgagaatggcggaactggcgagtagggcgggatggcgaggtagg
ggcggaCTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAGggccgctccaagtacctcccgtaccttaagtgcggaccgagcgcc
gcaggaaccctagtgatggagttggccactcctctctgcgctcctcactgagggcgccgaccaaaggtcggccgacggcggtttg
cccggcgccctcagtgagcgagcgagcgagctgcctgcagg (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 последовательно-

стей, 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 гAAV") в контексте настоящего описания относится к вышеуказанной экспрессионной кассете (или вышеуказанному экспрессионному вектору), которая заключена внутри капсида AAV.

Ген Сар, 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, р40. 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 (гAAV) 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

```
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPAAAPSGVGS LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRKRLNF
KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGSPYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSW
ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVA
TESYQVATNHNQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPML
GGFGMKHPPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQY
TSNYYSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (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:

```
TAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPAAAPSGVGS L
T
MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTS
GGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDN
NGVKTIANNLSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRS
SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQN
QQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGSPYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPG
PAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHN
QSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGMKHPPPPQI
LIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYSNNVE
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

MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTS
GGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDN
NGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRS
SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQN
QQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNP
GPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNH
QSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPPQI
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 табл. 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);
 нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;
 сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
 SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);
 нуклеиновая кислота, 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);
 нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;
 сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
 SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);
 нуклеиновая кислота, 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);
 нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;
 сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
 SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);
 нуклеиновая кислота, 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, адъювантах, 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 эксципиентов, 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 солибутилизаторы.

"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 "эксципиент" 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, пред-

ставленными 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 работ. 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% CO₂, 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% конfluenceности. 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% конfluenceности 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 трех 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 линейаризованной 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 непрякая 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 отмывали 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 ч 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 засеивали 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 трех 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 *Smn* мыши, но имеют в своем геноме по одной копии гена SMN2 человека и гена SMN1 человека с отсутствующим 7 экзоном (SMN1 \pm 7). 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 *Smn*, 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 10¹⁴ 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 путем амплификации со специфическими праймерами с кДНК, синтезированной на основе тотальной РНК клеток HEK293, 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 ре-

зультате была получена конструкция рAAV-SMN1.

В полученные ранее плазмиды рAAV-GFP и рAAV-SMN1 встроили дополнительную кассету для экспрессии miR-23a. Дополнительная кассета для экспрессии miR-23a состоит из промотора, гена интереса (miR-23a, получен с использованием ПЦП с геномной ДНК клеточной линии Huh7) и сигнала полиаденилирования. Целевые вектора были получены путем линеаризации по сайту PmlI векторов-реципиентов (рAAV-GFP, рAAV-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, транскрипционный 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 рAAV-SMN1, рAAV-GFP, рAAV-SMN1-miR-23a, рAAV-GFP-miR-23a вместе с другими плазмидами, 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 перmissive 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 определен 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 miR-23a (%) | 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-miR-23a | 843 | 33 |
| siSMN1 + AAV9-GFP-miR-23a | 768 | 26 |
| siNeg + AAV9-SMN1 | 116,4 | 16 |
| siSMN1 + AAV9-SMN1 | 77 | 8 |
| siNeg + AAV9-SMN1-miR-23a | 803 | 15 |
| siSMN1 + AAV9-SMN1-miR-23a | 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, напрямую 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-miR-23a | 98 | 14 |
| siSMN1 + AAV9-GFP-miR-23a | 73 | 19 |
| siNeg + AAV9-SMN1 | 124 | 21 |
| siSMN1 + AAV9-SMN1 | 110 | 13 |
| siNeg + AAV9-SMN1-miR-23a | 196 | 17 |
| siSMN1 + AAV9-SMN1-miR-23a | 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 мышью 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
ICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDGCIYPATIASIDFKRETC
VVVYTYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENSRSPGNKSDNIKPKSA
PWNSFLPPPPMPGPRLLGPGKPLKFNGLPPPPPPPPHLLSCWLPPFSPGPIPPPPPICPDSLDDA
DALGSM LISWYMSGYHTGYMGRQNKKEGRCSHSLN

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

DNA

Искусственная

ATGGCCATGAGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACAGCGT
GCTGTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGCCCTG
ATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGACATCT
GCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCCCAAGAAGAACAAGA
GCCAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGAAGGTGGGCGACAAGTGCAGCG
CCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAAGAGA
GAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGCGACC
TGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACGAGAA
CGAGAGCCAAGTGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGCAACAAGAGCGA
CAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCCTGCCCCCTCCCCCCCCTATGCCCG
GCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCCCCTCCTCCT
CCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCCAGCGGCCCTCCTATCATC
CCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCATGCT
GATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAACCAG
AAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAC

SEQ ID NO: 3 - микроРНК miR-23a

RNA

Искусственная

GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCC
AGGGAAUUUCCAACCGACC

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

DNA

Искусственная

CATGCAAGTTGCTGTAGCCTCCTTGTCCCGCATGGGCCCTCTAGGTATCTCTGCCTCT
CCAGTCCTGGGGCTGGAACGGAGGGCACAGCTAGGCTCCAGCTCCCCGTGTGGTGGCTCCTG
CATATGAGAAAAGAGCTTCCCTGTGATCAAAGGAAGCATCTGGGGACCTGGAGGGGAGGTG
TCCCCAAATCTCATTACCTCCTTTGCTCTCTCTCTTTCTCCCCTCCAGGTGCCAGCCTCTGG
CCCCGCCCGGTGCCCCCTACCCCTGTGCCACGGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATT
TGCTTCCTGTACAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCGACCCTGAGCTCTGCCACCGAG
GATGCTGCCCCGGGACGGGGTGGCAGAGAGGCCCGAAGCCTGTGCCTGGCCTGAGGAGCA
GGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTCCACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCGCC
CCCCAGGCCCTACCTCCTCTGGCCTTGCCGCTGTCCCCTGCTGCCGCTGTCTGCCTGCCA
TCCTGCTGCCTGGCCTCCCTGGGCTCTGCCTCCCCTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTGGTT
TGTTGACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACA

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

DNA

Искусственная

GGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCTTCCTGTCACAAATCACATTGCCAG
GGATTTCCAACCGACC

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

DNA

Искусственная

ctgcaggcagctgcgcgctgcctcactgaggccgcccggcgctcggcgacctftgctgcccggcctcagtgagcgagcgagc
gcccagagaggagtgccaactccatcactagggtcctgcggccgcacgctctagttattaatagtaataatcaattacgggtcattagttcatagccc

atatatggagttccgctfacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccat
 agtaacgCcaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagtafttaacggtaaactgccacttggcagtagatcaagtgtatcatatgccaaagtagc
 ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatcccagtagatgaccttattggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac
 gctattaccatggtgatcggttttggcagtagatcaatggcgctggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccccccattgacgtcaatggg
 agttgttttGcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctgtaacaactccgccccattgacgcaaatggcggtagcggtgtagcgtgggaggtct
 atataagcagagctcgttttagtaaccgtcagatcgctggagagccatccacgctgtttgacctccatagaagacacgggaccgatccagcctcgg
 cggattcgaatcccggcccgggaacggtgcattggaacgcggttccccgtccaagagtgagtaagtaccgctatagatctataggcccacaaaa
 aatgctttcttttaataatactttttttatcttatttctaactttccctaactctttttcagggcaataatgatacaatgtatcatgctctttgaccattcta
 aagaataacagtgataaatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagagtttcatattgtaata
 gcagctacaatccagctaccattctgcttttatttatggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctttgtaatacatgttcatacctctat
 ctctcccacagctcctgggaacgtgctgctgtgtgctgcccacttttgcaagaattgggattcgaacatCGATTGTAATTCAT
 GAGCCACCATGGCCATGAGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGTGCCTGAGCAAGAGGACA
 GCGTGTCTTTCAGAAGAGGCACCGGCCAGAGCGACGACAGCGACATCTGGGACGACACCGC
 CCTGATCAAGGCCTACGACAAGGCCGTGGCCAGCTTCAAGCACGCCCTGAAGAACGGCGAC
 ATCTGCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACCACCCCAAGAGAAAGCCCGCCAAGAAGAAC
 AAGAGCCAGAAGAAGAACACCGCCGCCAGCCTGCAGCAGTGAAGGTGGGCGACAAGTGC
 AGCGCCATCTGGAGCGAGGACGGCTGCATCTACCCCGCCACCATCGCCAGCATCGACTTCAA
 GAGAGAGACCTGCGTGGTGGTGTACACCGGCTACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCTGAGC
 GACCTGCTGAGCCCCATCTGCGAGGTGGCCAAACAACATCGAGCAGAACGCCCAAGAGAACG
 AGAACGAGAGCCAAGTGAACACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAAGCCCCGGCAACAAGA
 GCGACAACATCAAGCCCAAGAGCGCCCCCTGGAACAGCTTCCTGCCCCCTCCCCCCCCTATG
 CCCGGCCCTAGACTGGGCCCTGGCAAGCCTGGCCTGAAGTTCAACGGCCCCCCCCCCCCCTCC
 TCCTCCTCCTCCTCCTCACCTGCTGAGCTGCTGGCTGCCCCCTTCCCCAGCGGCCCTCCTAT
 CATCCCTCCTCCCCCCCCATCTGCCCGACAGCCTGGACGACGCCGACGCCCTGGGCAGCA
 TGCTGATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACCGGCTACTACATGGGCTTCAGACAGAAC
 CAGAAGGAGGGCCGGTGCAGCCACAGCCTGAAGTGAATctagagtcgacctgcagaagcttcctcagcagcgcct
 gctcagagatctacgggtgcatccctgtgacctccccagtgctctctggccctggaagttgccaactccagtgcccaccagcctgtcctaataaa
 aftaagtgcatcattttgtctgactaggtgtccttataatattatgggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtag
 ggccctcggggtctattgggaaccaagctggagtgagtgacacaatctggctcactgcaactcctccgctcctggttaagcagattctcctgctcagc
 ctcccagttgtgggattccagcatgcatgaccaggtcagctaatfttttttttggtagagacggggttccacatattggccaggtgctgtccaac
 tctaactcaggtgatctaccaccttggcctccaaatgctgggattfacaggcgtgaaccactgctccttccctgctctctgatttttaggtaaccac
 TAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACttgactgggacagcctattttgctagttgtttgtttgtttgtttgatgagagcgtatg
 ttagtactatcgattcacacaaaaaccaacacacagatgtaataaaaataaagatattttatttgcggccgcTGTTCTGCTGAACTGAGC
 CAGTGTACACAAACCAACTGTGTTTCAGCTCAGTAGGCACGGGAGGCAGAGCCCAGGGAGG
 CCAGGCAGCAGGATGGCAGGCAGACAGGCCGGCAGCAGGGGACAGGCCGGAAGGCCAGAGG
 AGGTGAGGGCCCTGGGGGGCGGAACCTTAGCCACTGTGAACACGACTTGGTGTGGACCCTGCT
 CACAAGCAGCTAAGCCCTGCTCCTCAGGCCAGGCACAGGCTTCGGGGCCTCTCTGCCACCCC
 GTCCCCGGGCAGCATCCTCGGTGGCAGAGCTCAGGGTCGGTTGGAATCCCTGGCAATGTGA

TTTGTGACAGGAAGCAAATCCCATCCCCAGGAACCCCAGCCGGCCGTGGCACAGGGGTGAG
 GGGGGACCCGGGCGGGGCCAGAGGCTGGCACCTGGAGGGGAGAAAGAGAGAGAGAGCAAA
 GGAGGTAATGAGATTTGGGGACACCTCCCCTCCAGGTCCCCAGATGCTTCCTTTGATCACAG
 GGAAGCTCTTTTCTCATATGCAGGAGCCACCACCGGGGAGCTGGAGCCTAGCTGTGCCCTC
 CGTTCAGCCCCAGGACTGGAGAGGCAGAGATACCTAGAGGGCCCATGCGGGACAAGGAGG
 CTACAGCAACTTGCATGgccgcagcttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctactactctggaatagctcagaggccga
 ggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagcagatggggcgagaaatggcggaactggcgagtagggcgggatggcgaggat
 tagggcggggaCTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAgggcccctccaagtacctcccgtaccttaagtgcggaccgagcg
 gccgcaggaaccttagtgatggagttggccactcctctctgcgcctcctcctcactgagccggcgaccaaaagtcgcccagccgggc
 ttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagg

SEQ ID NO: 7 – Аминокислотная последовательность белка VP1 AAV9

PRT

природная

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNG
 GLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVF
 QAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVP
 DPQPIGEPAAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVVITSTRT
 WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVMI
 PQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQLDRLMNP
 LIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFA
 WPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEI
 KTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHTDGN
 FHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
 WNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 8 – Аминокислотная последовательность белка VP2 AAV9

PRT

природная

TAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPAAAPSGV
 GSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS
 NSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEV
 TDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVMIQYGYLTLNDGSQAV

GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSG
QNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLM
NPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVAT
NHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPP
PQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSN
VEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 9 – Аминокислотная последовательность белка VP3 AAV9

PRT

природная

MASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQ
ISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDRWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKE
VTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQA
VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGS
GQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSL
MNPMPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVA
TNHSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPP
PPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSN
NVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

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

DNA

природная

cctgcaggcagctgcgctcgcctcactgaggccgccccggcgctggcgacaccttggtcgccccgcctcagtgagcgagcgagc
gcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggtcct

SEQ ID NO: 11 - CMV (Цитомегаловирусный) энхансер

DNA

природная

cgttacataacttacgtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaac
gCcaatagggactttcattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacgcccaactggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctat
tgacgtcaatgacgtaaatggcccgcctggcattatgccagtagatgacctatgggactttcctactggcagtagatctacgtattagtcacgctatta
ccatg

SEQ ID NO: 12 - CMV (Цитомегаловирусный) промотер

DNA

природная

gtgatcggtttggcagtacatcaatggcggtgtagcggttgactcacgggattccaagtccacccattgacgtcaatgggagtt
gttttgGсaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctgtaacaactccgcccaattgacgcaaatggcggtagcggtgtacgggtgggaggtctatat
aagcagagct

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

DNA

природная

cgaatcccgccgggaacggtgcatggaacggtgattccccgtgccaagagtacgtaagtaccgcctatagagtctatagccccaca
aaaatgctttctttaaataacttttggttatcttatttctaactttccctaactcttcttccagggaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccatt
ctaaagaataacagtgataattctgggtaaggcaatagcaatattctgcatataaattctgcatataaattgtaactgatgtaagggttcatattgcta
atagcagctacaatccagctaccattctgtttattttatggtgggataaggctggattattctgagtccaagctaggccctttgctaatacatgttcataact
ttatctctccacagctctgggcaacgtgctggtctgtgctggtgcccactcttggcaagaattgggat

SEQ ID NO: 14- сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования (поли(A))

гормона роста человека)

DNA

природная

acgggtggcatccctgtgacccctcccagtgccctctctgcccctggaagttgccactccagtgcccaccagcctgtcctaataaaaattaa
gttgcacatctttgctgactaggtgctcttataatattatgggtggaggggggtgatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcc
tgcggggctattgggaaccaagctggagtgagtgccacaatctggctcactgcaatctcgcctcctgggtcaagcgattctcctcctcagcctcc
cgagttgtgggattccaggtcatgaccaggtcagctaatttttttggtagagacggggttcaccatattggccaggtggtctccaactcct
aatctcaggtgatctaccaccttggcctcccaaatgctgggattacagcggtgaaccactgctccctcctctcctt

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

DNA

Природная

TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGtcccccccctaaactccgccatcccccccctaaactccgccagttccgc
 ccatttccccccatcgctgactaattttttatftatgcagaggccgagccgctcgccctgagctatccagaagtagtgaggaggctttttggag
 gcctaggttttgcaaaaagct

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

DNA

Природная

aataaaatatctttatcttatttaccatctgtgtgtgtttttgtggaatcgatagtaactacatcgctctccatcaaaaacaaacgaaacaaaac
 aaactagcaaaaatagctgtccccagtgcaaaGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT

SEQ ID NO: 17 - правый (второй) ITR

DNA

природная

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ООО "АНАБИОН"

<120> Синергетическое действие SMN1 и miR-23a при лечении спинальной
 мышечной атрофии

<160> 17

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 294

<212> PRT

<213> Природная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность белка SMN1

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Met | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Pro | Glu | Gln | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Asp | Ser | Val | Leu | Phe | Arg | Arg | Gly | Thr | Gly | Gln | Ser | Asp | Asp | Ser | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ile | Trp | Asp | Asp | Thr | Ala | Leu | Ile | Lys | Ala | Tyr | Asp | Lys | Ala | Val | Ala |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Phe | Lys | His | Ala | Leu | Lys | Asn | Gly | Asp | Ile | Cys | Glu | Thr | Ser | Gly |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Lys | Pro | Lys | Thr | Thr | Pro | Lys | Arg | Lys | Pro | Ala | Lys | Lys | Asn | Lys | Ser |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Gln | Lys | Lys | Asn | Thr | Ala | Ala | Ser | Leu | Gln | Gln | Trp | Lys | Val | Gly | Asp |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Cys | Ser | Ala | Ile | Trp | Ser | Glu | Asp | Gly | Cys | Ile | Tyr | Pro | Ala | Thr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Ile | Ala | Ser | Ile | Asp | Phe | Lys | Arg | Glu | Thr | Cys | Val | Val | Val | Tyr | Thr |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| Gly | Tyr | Gly | Asn | Arg | Glu | Glu | Gln | Asn | Leu | Ser | Asp | Leu | Leu | Ser | Pro |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ile | Cys | Glu | Val | Ala | Asn | Asn | Ile | Glu | Gln | Asn | Ala | Gln | Glu | Asn | Glu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |

047326

Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro
165 170 175
Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser
180 185 190
Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly
195 200 205
Lys Pro Gly Leu Lys Phe Asn Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
210 215 220
Pro Pro His Leu Leu Ser Cys Trp Leu Pro Pro Phe Pro Ser Gly Pro
225 230 235 240
Pro Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp
245 250 255
Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr
260 265 270
His Thr Gly Tyr Tyr Met Gly Phe Arg Gln Asn Gln Lys Glu Gly Arg
275 280 285
Cys Ser His Ser Leu Asn
290

<210> 2
<211> 882
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок SMN1

<400> 2
atggccatga gcagcggcgg cagcggcggc ggcgtgcctg agcaagagga cagcgtgctg
60
ttcagaagag gcaccggcca gagcgcgcac agcgacatct gggacgacac cgccctgatc
120
aaggcctacg acaaggccgt ggccagcttc aagcacgccc tgaagaacgg cgacatctgc
180
gagaccagcg gcaagcccaa gaccaccccc aagagaaagc ccgccaagaa gaacaagagc
240
cagaagaaga acaccgccgc cagcctgcag cagtggaagg tgggcgacaa gtgcagcgcc
300
atctggagcg aggacggctg catctacccc gccaccatcg ccagcatcga cttcaagaga
360
gagacctgcg tggtggtgta caccggctac ggcaacagag aggagcagaa cctgagcgac
420
ctgctgagcc ccatctgcga ggtggccaac aacatcgagc agaacgcccc agagaacgag
480
aacgagagcc aagtgagcac cgacgagagc gagaacagca gaagccccgg caacaagagc
540
gacaacatca agcccaagag cggcccctgg aacagcttcc tgccccctcc cccccctatg
600

ccccggcccta gactggggccc tggcaagcct ggctgaagt tcaacggccc cccccccct
660

cctcctcctc ctctcctca cctgctgagc tgctggctgc ccccttccc cagcggcct
720

cctatcatcc ctctcccc cccatctgc cccgacagcc tggacgagc cgacgcctg
780

ggcagcatgc tgatcagctg gtacatgagc ggctaccaca ccggctacta catgggcttc
840

agacagaacc agaaggagg ccggtgcagc cacagcctga ac
882

<210> 3

<211> 73

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> микроРНК miR-23a

<400> 3

ggccggcggg gguccgggg gaugggauuu gcuccguc aaaaaaca uugccaggga
60

uuccsaaccg acc

73

<210> 4

<211> 648

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует микроРНК
miR-23a (до процессинга)

<400> 4

catgcaagtt gctgtagcct cctgtcccg catgggcct ctaggtatct ctgcctctcc
60

agtctgggg ctggaacgga gggcacagct aggctccagc tcccgtgtg gtggctcctg
120

catatgagaa aagagcttcc ctgtgatcaa aggaagcatc tggggacctg gaggggaggt
180

gtccccaaat ctattacct cctttgctct ctctctcttt ctcccctcca ggtgccagcc
240

tctggccccg cccggtgcc ccctacccc tgtgccacgg ccggctgggg ttcttgggga
300

tgggatttgc ttctgtcac aaatcacatt gccagggatt tccaaccgac cctgagctct

360

gccaccgagg atgctgcccg gggacggggt ggcagagagg ccccgaagcc tgtgctggc
420

ctgaggagca gggcttagct gcttgtgagc aggggtccaca ccaagtcgtg ttcacagtgg
480

ctaagttccg cccccaggc cctcacctcc tctggccttg ccgcctgtcc cctgctgccg
540

cctgtctgcc tgccatcctg ctgcctggcc tccctgggct ctgcctcccg tgcctactga
600

gctgaaacac agttggtttg tgtacactgg ctcagttcag caggaaca
648

<210> 5

<211> 73

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует микроРНК
miR-23a (после процессинга)

<400> 5

ggccggctgg ggttcctggg gatgggattt gcttcctgtc acaaatcaca ttgccaggga
60

tttccaaccg acc

73

<210> 6

<211> 3972

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты экспрессионной кассеты
(полная)

<400> 6

cctgcaggca gctgcgctgt cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgacctt
60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggcaca ctccatcact
120

aggggttcct gcggccgcac gcgtctagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag
180

ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc ccgcctggct
240

gaccgccccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc

300

caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccaacttg
360

cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaa
420

ggccccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
480

tctacgtatt agtcatcgct attacatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
540

gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
600

gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
660

tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtcta tataagcaga gctcgtttag
720

tgaaccgtca gatcgcctgg agacgccatc cacgctggtt tgacctccat agaagacacc
780

gggaccgatc cagcctccgc ggattcgaat cccggccggg aacgggtgcat tggaacgcgg
840

attccccgtg ccaagagtga cgtaagtacc gcctatagag tctataggcc cacaaaaaat
900

gctttcttct ttaatatatac ttttttggtt atcttatttc taatacttct cctaattct
960

ttctttcagg gcaataatga tacaatgat catgcctctt tgcaccattc taaagaataa
1020

cagtgataat ttctgggtta aggcaatagc aatatttctg catataaata tttctgcata
1080

taaattgtaa ctgatgtaag aggtttcata ttgctaatag cagctacaat ccagctacca
1140

ttctgctttt attttatggt tgggataagg ctggattatt ctgagtccaa gctaggccct
1200

tttgctaatac atgttcatac ctcttatctt cctcccacag ctctgggca acgtgctggt
1260

ctgtgtgctg gcccatcact ttggcaaaga attgggattc gaacatcgat tgtaattcat
1320

gagccaccat ggccatgagc agcggcggca gcggcggcgg cgtgcctgag caagaggaca
1380

gcgtgctggt cagaagaggc accggccaga gcgacgacag cgacatctgg gacgacaccg
1440

ccctgatcaa ggccctacgac aaggccgtgg ccagcttcaa gcacgccctg aagaacggcg

1500

acatctgcga gaccagcggc aagcccaaga ccacccccaa gagaaagccc gccagaaga
1560

acaagagcca gaagaagaac accgccgcca gcctgcagca gtggaagggtg ggcgacaagt
1620

gcagcggccat ctggagcgag gacggctgca tctacccccg caccatcgcc agcatcgact
1680

tcaagagaga gacctgcgtg gtggtgtaca ccggctacgg caacagagag gagcagaacc
1740

tgagcggacct gctgagcccc atctgcgagg tggccaacaa catcgagcag aacgcccaag
1800

agaacgagaa cgagagccaa gtgagcaccg acgagagcga gaacagcaga agccccggca
1860

acaagagcga caacatcaag cccaagagcg ccccctggaa cagcttcctg ccccctcccc
1920

cccctatgcc cggccctaga ctgggcctg gcaagcctgg cctgaagttc aacggcccc
1980

ccccccctcc tctcctcct cctcctcacc tgctgagctg ctggctgccc cccttcccc
2040

gcggccctcc tatcatcct cctccccccc ccatctgccc cgacagcctg gacgacgcg
2100

acgccctggg cagcatgctg atcagctggt acatgagcgg ctaccacacc ggctactaca
2160

tgggcttcag acagaaccag aaggagggcc ggtgcagcca cagcctgaac tgatctagag
2220

tcgacctgca gaagcttgcc tcgagcagcg ctgctcgaga gatctacggg tggcatcct
2280

gtgaccctc cccagtgcct ctctggccc tgggaagttgc cactccagtg cccaccagcc
2340

ttgtcctaataaaaattaagt tgcattcatt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta
2400

tgggggtggag ggggggtggt tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct
2460

gcggggtcta ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggtc actgcaatct
2520

ccgctcctg ggttcaagcg attctcctgc ctgagcctcc cgagttggtg ggattccagg
2580

catgcatgac caggctcagc taatttttgt ttttttggtg gagacggggt ttcaccatat
2640

tggccaggct ggtctccaac tcctaattctc aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat

2700

tgctgggatt acaggcgtga accactgctc cttccctgt cttctgatt ttgtaggtaa
2760

ccactagaga aatgttctgg cacctgcact tgcactgggg acagcctatt ttgctagttt
2820

gttttgtttc gttttgtttt gatggagagc gtatgttagt actatcgatt cacacaaaa
2880

accaacacac agatgtaatg aaaataaaga tattttattg cggccgctgt tcctgctgaa
2940

ctgagccagt gtacacaaac caactgtggt tcagctcagt aggcacggga ggcagagccc
3000

agggaggcca ggcagcagga tggcaggcag acagggcgca gcaggggaca ggcggcaagg
3060

ccagaggagg tgagggcctg gggggcggaa cttagccact gtgaacacga cttggtgtgg
3120

accctgctca caagcagcta agccctgctc ctcaggccag gcacaggctt cggggcctct
3180

ctgccacccc gtccccgggc agcatcctcg gtggcagagc tcagggtcgg ttggaaatcc
3240

ctggcaatgt gatttgtgac aggaagcaaa tcccatcccc aggaacccca gccggccgtg
3300

gcacaggggt gaggggggca ccgggcgggg ccagaggctg gcacctggag gggagaaaga
3360

gagagagagc aaaggaggta atgagatttg gggacacctc ccctccaggt cccagatgc
3420

ttcctttgat cacaggaag ctcttttctc atatgcagga gccaccacac ggggagctgg
3480

agcctagctg tgcctccgt tccagccca ggactggaga ggcagagata cctagagggc
3540

ccatgcggga caaggaggct acagcaactt gcatggccgc agctttttgc aaaagcctag
3600

gcctccaaaa aagcctcctc actacttctg gaatagctca gaggccgagg cggcctcggc
3660

ctctgcataa ataaaaaaaa ttagtcagcg atggggcgga gaatgggcgg aactgggcgg
3720

agttaggggc gggatgggcg gagttagggg cgggactatg gttgctgact aattgagatg
3780

cagggccgct ccaagtacct cccgtacctt aagtgcggac cgagcggccg caggaacccc
3840

tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgtc gctcactgag gccgggcgac

3900

caaaggtcgc ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca
3960

gctgcctgca gg
3972

<210> 7

<211> 736

<212> PRT

<213> Природная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность белка VP1 AAV9

<400> 7

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ala | Asp | Gly | Tyr | Leu | Pro | Asp | Trp | Leu | Glu | Asp | Asn | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Glu | Gly | Ile | Arg | Glu | Trp | Trp | Ala | Leu | Lys | Pro | Gly | Ala | Pro | Gln | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Lys | Ala | Asn | Gln | Gln | His | Gln | Asp | Asn | Ala | Arg | Gly | Leu | Val | Leu | Pro |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Tyr | Lys | Tyr | Leu | Gly | Pro | Gly | Asn | Gly | Leu | Asp | Lys | Gly | Glu | Pro |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Val | Asn | Ala | Ala | Asp | Ala | Ala | Ala | Leu | Glu | His | Asp | Lys | Ala | Tyr | Asp |
| 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Gln | Gln | Leu | Lys | Ala | Gly | Asp | Asn | Pro | Tyr | Leu | Lys | Tyr | Asn | His | Ala |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Asp | Ala | Glu | Phe | Gln | Glu | Arg | Leu | Lys | Glu | Asp | Thr | Ser | Phe | Gly | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Asn | Leu | Gly | Arg | Ala | Val | Phe | Gln | Ala | Lys | Lys | Arg | Leu | Leu | Glu | Pro |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Leu | Gly | Leu | Val | Glu | Glu | Ala | Ala | Lys | Thr | Ala | Pro | Gly | Lys | Lys | Arg |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |
| Pro | Val | Glu | Gln | Ser | Pro | Gln | Glu | Pro | Asp | Ser | Ser | Ala | Gly | Ile | Gly |
| 145 | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Lys | Ser | Gly | Ala | Gln | Pro | Ala | Lys | Lys | Arg | Leu | Asn | Phe | Gly | Gln | Thr |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Gly | Asp | Thr | Glu | Ser | Val | Pro | Asp | Pro | Gln | Pro | Ile | Gly | Glu | Pro | Pro |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Ala | Ala | Pro | Ser | Gly | Val | Gly | Ser | Leu | Thr | Met | Ala | Ser | Gly | Gly | Gly |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ala | Pro | Val | Ala | Asp | Asn | Asn | Glu | Gly | Ala | Asp | Gly | Val | Gly | Ser | Ser |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Ser | Gly | Asn | Trp | His | Cys | Asp | Ser | Gln | Trp | Leu | Gly | Asp | Arg | Val | Ile |
| 225 | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Thr | Thr | Ser | Thr | Arg | Thr | Trp | Ala | Leu | Pro | Thr | Tyr | Asn | Asn | His | Leu |
| | | | 245 | | | | | | | 250 | | | | 255 | |
| Tyr | Lys | Gln | Ile | Ser | Asn | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Ser | Ser | Asn | Asp | Asn |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Ala | Tyr | Phe | Gly | Tyr | Ser | Thr | Pro | Trp | Gly | Tyr | Phe | Asp | Phe | Asn | Arg |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Phe | His | Cys | His | Phe | Ser | Pro | Arg | Asp | Trp | Gln | Arg | Leu | Ile | Asn | Asn |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Asn | Trp | Gly | Phe | Arg | Pro | Lys | Arg | Leu | Asn | Phe | Lys | Leu | Phe | Asn | Ile |
| 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Gln | Val | Lys | Glu | Val | Thr | Asp | Asn | Asn | Gly | Val | Lys | Thr | Ile | Ala | Asn |

047326

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| Asn | Leu | Thr | Ser | Thr | Val | Gln | Val | Phe | Thr | Asp | Ser | Asp | Tyr | Gln | Leu | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| Pro | Tyr | Val | Leu | Gly | Ser | Ala | His | Glu | Gly | Cys | Leu | Pro | Pro | Phe | Pro | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| Ala | Asp | Val | Phe | Met | Ile | Pro | Gln | Tyr | Gly | Tyr | Leu | Thr | Leu | Asn | Asp | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| Gly | Ser | Gln | Ala | Val | Gly | Arg | Ser | Ser | Phe | Tyr | Cys | Leu | Glu | Tyr | Phe | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | |
| Pro | Ser | Gln | Met | Leu | Arg | Thr | Gly | Asn | Asn | Phe | Gln | Phe | Ser | Tyr | Glu | | |
| | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 | | |
| Phe | Glu | Asn | Val | Pro | Phe | His | Ser | Ser | Tyr | Ala | His | Ser | Gln | Ser | Leu | | |
| | | 420 | | | | | 425 | | | | | | 430 | | | | |
| Asp | Arg | Leu | Met | Asn | Pro | Leu | Ile | Asp | Gln | Tyr | Leu | Tyr | Tyr | Leu | Ser | | |
| | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | | | | |
| Lys | Thr | Ile | Asn | Gly | Ser | Gly | Gln | Asn | Gln | Gln | Thr | Leu | Lys | Phe | Ser | | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | | 460 | | | | | |
| Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Asn | Met | Ala | Val | Gln | Gly | Arg | Asn | Tyr | Ile | Pro | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | | 475 | | | | 480 | | |
| Gly | Pro | Ser | Tyr | Arg | Gln | Gln | Arg | Val | Ser | Thr | Thr | Val | Thr | Gln | Asn | | |
| | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | 495 | | | |
| Asn | Asn | Ser | Glu | Phe | Ala | Trp | Pro | Gly | Ala | Ser | Ser | Trp | Ala | Leu | Asn | | |
| | | 500 | | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | |
| Gly | Arg | Asn | Ser | Leu | Met | Asn | Pro | Gly | Pro | Ala | Met | Ala | Ser | His | Lys | | |
| | 515 | | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | |
| Glu | Gly | Glu | Asp | Arg | Phe | Phe | Pro | Leu | Ser | Gly | Ser | Leu | Ile | Phe | Gly | | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | | 540 | | | | | |
| Lys | Gln | Gly | Thr | Gly | Arg | Asp | Asn | Val | Asp | Ala | Asp | Lys | Val | Met | Ile | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | |
| Thr | Asn | Glu | Glu | Glu | Ile | Lys | Thr | Thr | Asn | Pro | Val | Ala | Thr | Glu | Ser | | |
| | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | 575 | | | |
| Tyr | Gly | Gln | Val | Ala | Thr | Asn | His | Gln | Ser | Ala | Gln | Ala | Gln | Ala | Gln | | |
| | | 580 | | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | |
| Thr | Gly | Trp | Val | Gln | Asn | Gln | Gly | Ile | Leu | Pro | Gly | Met | Val | Trp | Gln | | |
| | 595 | | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | |
| Asp | Arg | Asp | Val | Tyr | Leu | Gln | Gly | Pro | Ile | Trp | Ala | Lys | Ile | Pro | His | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | |
| Thr | Asp | Gly | Asn | Phe | His | Pro | Ser | Pro | Leu | Met | Gly | Gly | Phe | Gly | Met | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | |
| Lys | His | Pro | Pro | Pro | Gln | Ile | Leu | Ile | Lys | Asn | Thr | Pro | Val | Pro | Ala | | |
| | | | 645 | | | | | | 650 | | | | | 655 | | | |
| Asp | Pro | Pro | Thr | Ala | Phe | Asn | Lys | Asp | Lys | Leu | Asn | Ser | Phe | Ile | Thr | | |
| | | 660 | | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | |
| Gln | Tyr | Ser | Thr | Gly | Gln | Val | Ser | Val | Glu | Ile | Glu | Trp | Glu | Leu | Gln | | |
| | 675 | | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | |
| Lys | Glu | Asn | Ser | Lys | Arg | Trp | Asn | Pro | Glu | Ile | Gln | Tyr | Thr | Ser | Asn | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | |
| Tyr | Tyr | Lys | Ser | Asn | Asn | Val | Glu | Phe | Ala | Val | Asn | Thr | Glu | Gly | Val | | |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | |
| Tyr | Ser | Glu | Pro | Arg | Pro | Ile | Gly | Thr | Arg | Tyr | Leu | Thr | Arg | Asn | Leu | | |
| | | | 725 | | | | | | 730 | | | | | 735 | | | |

<210> 8

<211> 599

<212> PRT

<213> Природная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность белка VP2 AAV9

<400> 8

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro
 1 5 10 15
 Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys
 20 25 30
 Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro
 35 40 45
 Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu
 50 55 60
 Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln
 85 90 95
 Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu
 100 105 110
 Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp
 130 135 140
 Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp
 145 150 155 160
 Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu
 165 170 175
 Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn
 180 185 190
 Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe
 195 200 205
 Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu
 210 215 220
 Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr
 225 230 235 240
 Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser
 245 250 255
 Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn
 260 265 270
 Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser
 275 280 285
 Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
 290 295 300
 Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn
 305 310 315 320
 Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val
 325 330 335
 Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val
 340 345 350
 Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly
 355 360 365
 Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly
 370 375 380
 Pro Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val
 405 410 415
 Asp Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr
 420 425 430
 Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln
 435 440 445

Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile
 450 455 460
 Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro
 465 470 475 480
 Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro
 485 490 495
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
 500 505 510
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp
 515 520 525
 Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val
 530 535 540
 Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro
 545 550 555 560
 Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe
 565 570 575
 Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr
 580 585 590
 Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 595

<210> 9

<211> 534

<212> PRT

<213> Природная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность белка VP3 AAV9

<400> 9

Met Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp
 20 25 30
 Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly
 50 55 60
 Gly Ser Ser Asn Asp Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly
 65 70 75 80
 Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp
 85 90 95
 Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn
 100 105 110
 Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly
 115 120 125
 Val Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr
 130 135 140
 Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly
 145 150 155 160
 Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly
 165 170 175
 Tyr Leu Thr Leu Asn Asp Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Phe
 180 185 190
 Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn
 195 200 205
 Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
 210 215 220
 Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln

<210> 11
 <211> 304
 <212> DNA
 <213> Природная последовательность

<220>
 <223> CMV (Цитомегаловирусный) энхансер

<400> 11
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt
 60

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc attgacgtca
 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc
 180

aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta
 240

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac
 300

catg
 304

<210> 12
 <211> 204
 <212> DNA
 <213> Природная последовательность

<220>
 <223> CMV (Цитомегаловирусный) промотер

<400> 12
 gtgatgacggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt
 60

ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac
 120

tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg
 180

tgggaggtct atataagcag agct
 204

<210> 13
 <211> 493
 <212> DNA
 <213> Природная последовательность

<220>
 <223> интрон гена hBG1 (Субъединица гемоглобина гамма-1)

<400> 13

cgaatcccgg cggggaacgg tgcattggaa cgcggattcc ccgtgccaa agtgacgtaa
60

gtaccgccta tagagtctat aggcccacaa aaaatgcttt cttcttttaa tatacttttt
120

tgtttatctt atttctaata ctttccctaa tctctttctt tcagggcaat aatgatacaa
180

tgtatcatgc ctctttgcac cattctaaag aataacagtg ataatttctg ggttaaggca
240

atagcaatat ttctgcatat aaatatttct gcatataaat tgtaactgat gtaagagggt
300

tcatattgct aatagcagct acaatccagc taccattctg cttttatttt atgggtggga
360

taaggctgga ttattctgag tccaagctag gcccttttgc taatcatggt catacctctt
420

atcttcctcc cacagctcct gggcaacgtg ctgggtctgtg tgctggccca tcactttggc
480

aaagaattgg gat
493

<210> 14

<211> 479

<212> DNA

<213> Природная последовательность

<220>

<223> сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования
(поли(A)) гормона роста человека)

<400> 14

acgggtggca tcctgtgac ccctcccag tgcctctcct gccctggaa gttgccaactc
60

cagtgccac cagccttgtc ctaataaaat taagttgcat cattttgtct gactaggtgt
120

ccttctataa tattatgggg tggagggggg tggatggag caaggggcaa gttgggaaga
180

caacctgtag ggctgcggg gtctattggg aaccaagctg gagtgcagtg gcacaatctt
240

ggctcactgc aatctccgcc tcctgggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccagat
300

tgttgggatt ccaggcatgc atgaccaggc tcagctaatt tttgtttttt tggtagagac
360

ggggtttcac catattggcc aggctgtct ccaactccta atctcaggtg atctaccac

420

cttggcctcc caaattgctg ggattacagg cgtgaaccac tgctcccttc cctgtcctt
479

<210> 15
<211> 202
<212> DNA
<213> Природная последовательность

<220>
<223> SV40 промотор (промотор вируса обезьяны 40)

<400> 15
tgcattctcaa ttagtcagca accatagctc cggccctaac tccgcccata ccgcccctaa
60

ctccgcccag ttccgcccata tctccgcccc atcgctgact aatttttttt atttatgcag
120

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag
180

gcctaggctt ttgcaaaaag ct
202

<210> 16
<211> 154
<212> DNA
<213> Природная последовательность

<220>
<223> сигнал полиаденилирования SV40 (сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40)

<400> 16
aataaaatat ctttattttc attacatctg tgtgttggtt ttttgtgtga atcgatagta
60

стаacatacg ctctccatca aaacaaaacg aaacaaaaca aactagcaaa ataggctgtc
120

cccagtgcaa gtgcaggtgc cagaacattt ctct
154

<210> 17
<211> 141
<212> DNA
<213> Природная последовательность

<220>
<223> правый (второй) ITR

<400> 17

aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg
60

ccgggagacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggccgctca gtgagcgagc
120

gagcgcgcag ctgcctgcag g
141

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 нуклеиновая кислота, 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);

нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;

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

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);

нуклеиновая кислота, 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. Рекомбинантный 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. Рекомбинантный 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);

нуклеиновая кислота, которая кодирует белок SMN1;

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

SV40 промотер (промотер вируса обезьяны 40);

нуклеиновая кислота, 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 рекомбинантный вирус на основе AAV9 по пп.9-14 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

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

17. Применение рекомбинантного 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 рекомбинантного 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.

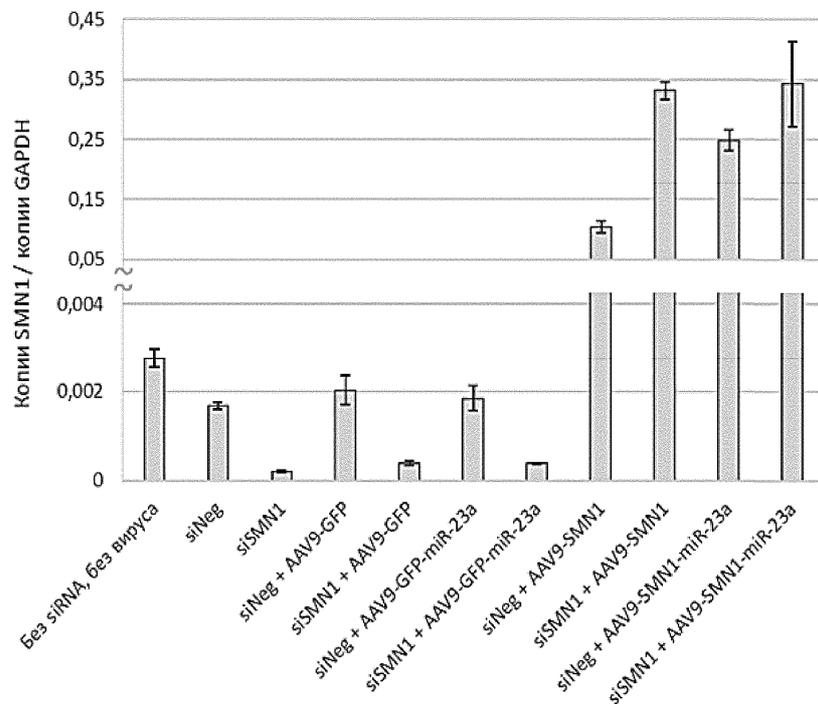
19. Применение рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп.9-14 или композиции по п.15 для лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который имеет спинальную мышечную атрофию.

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.

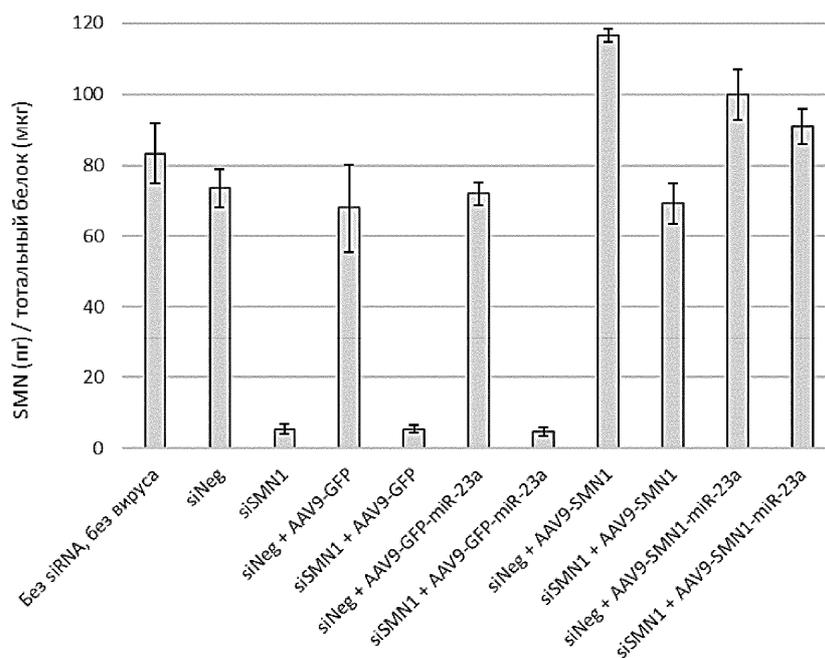
21. Способ обеспечения белком SMN субъекта со спинальной мышечной атрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп.9-14 или композиции по п.15 в клетки субъекта, нуждающегося в этом.

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.

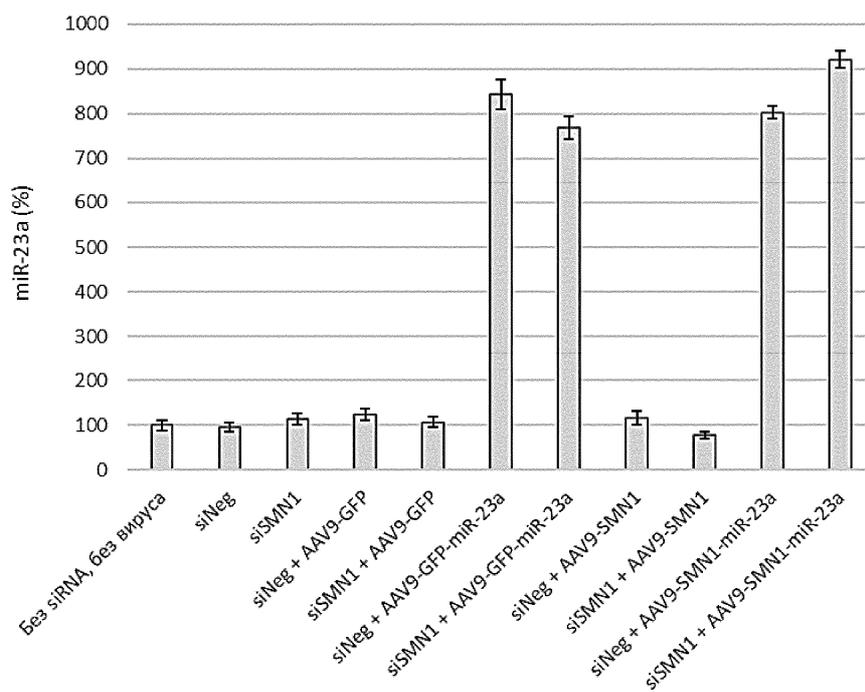
23. Способ лечения спинальной мышечной атрофии у субъекта, который включает ведение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса на основе AAV9 по пп.9-14 или композиции по п.15 субъекту со спинальной мышечной атрофией.



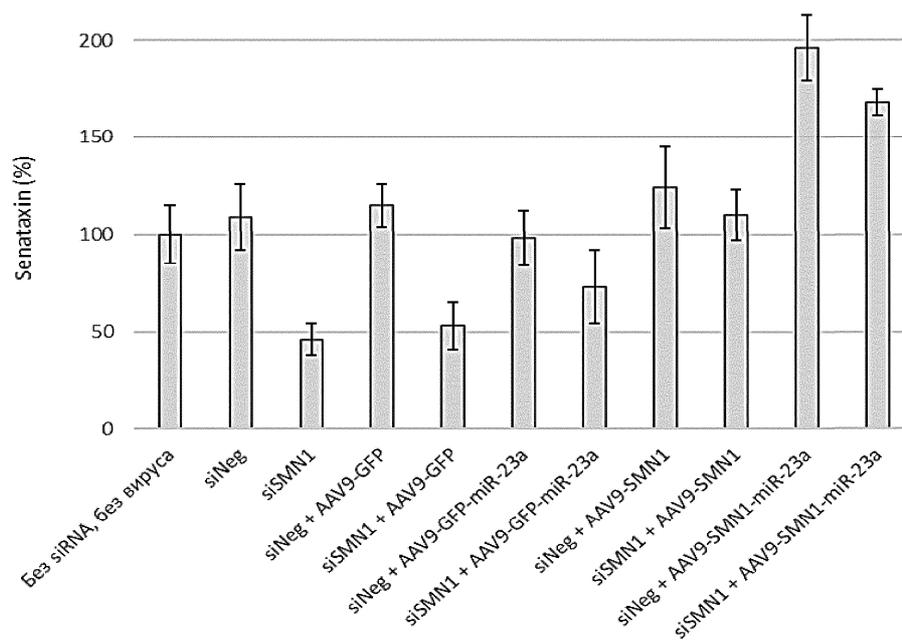
Фиг. 1



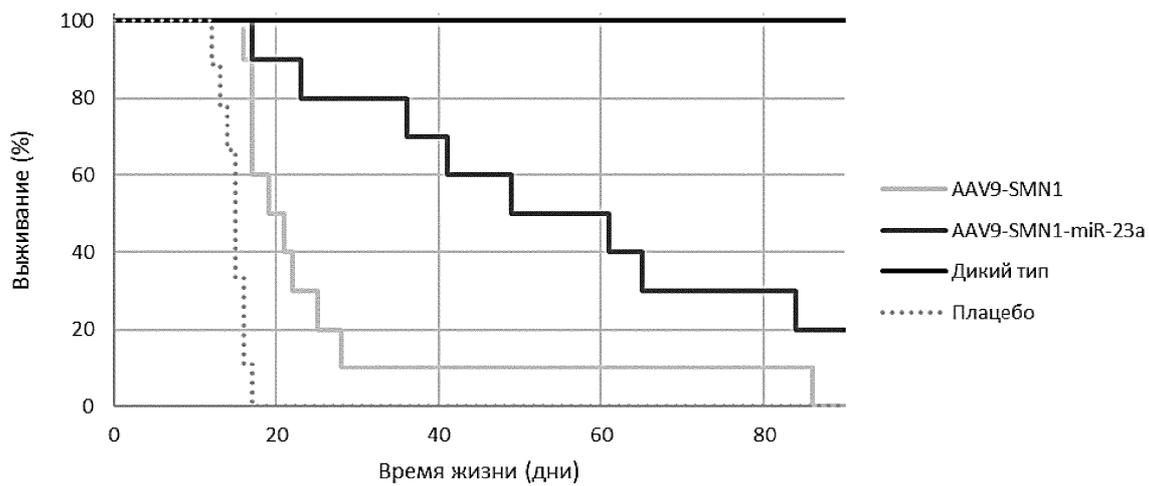
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2