

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034575

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.21

(21) Номер заявки
201591992

(22) Дата подачи заявки
2014.04.18

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ЭФФЕКТИВНАЯ ДОСТАВКА БОЛЬШИХ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ ДВОЙНЫХ AAV ВЕКТОРОВ

(31) 61/813,342

(32) 2013.04.18

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/EP2014/058000

(87) WO 2014/170480 2014.10.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФОНДАЦЬОНЕ ТЕЛЕТОН (ИТ)

(72) Изобретатель:
Аурицио Альберто, Колелла
Паскуалина, Трапани Ивана (ИТ)

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

(56) US-A1-2010003218
WO-A2-2008106644

V.S. LOPES ET AL.: "Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus", GENE THERAPY, vol. 20, no. 8, 24 January 2013 (2013-01-24), pages 824-833, XP055127767, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2013.3, cited in the application, page 829-831

WO-A1-2009103562

US-A1-2010209414

WO-A1-2013075008

IVANA TRAPANI ET AL.: "Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors", EMBO MOLECULAR MEDICINE, December 2013 (2013-12), pages n/a-n/a, XP055127533, ISSN: 1757-4676, DOI: 10.1002/emmm.201302948, page 195-201

MICHELLE E. MCCLEMENTS ET AL.: "Gene therapy for retinal disease", TRANSLATIONAL RESEARCH, vol. 161, no. 4, April 2013 (2013-04), pages 241-254, XP055127813, ISSN: 1931-5244, DOI: 10.1016/j.trsl.2012.12.007, page 246-248

(57) Изобретение относится к конструктам, векторам, соответствующим клеткам-хозяина и фармацевтическим композициям, которые позволяют эффективную генную терапию, в частности генов больше чем 5 т.н.

034575 B1

034575 B1

034575 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к конструктам, векторам, соответствующим клеткам-хозяина и фармацевтическим композициям, которые позволяют эффективную генную терапию, в частности генов больше чем 5 т.н.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Наследственные дегенерации сетчатки (IRD) с общемировой распространенностью 1/2000 (1) являются главной причиной слепоты во всем мире. Среди наиболее частых и тяжелых IRD - пигментный ретинит (RP), амавроз Лебера (LCA) и болезнь Штаргардта (STGD), которые наиболее часто являются наследуемыми в виде моногенных состояний. Большинство мутаций, вызывающих IRD, происходят в генах, экспрессируемых в нейрональных фоторецепторах (PR), палочках и/или колбочках в сетчатке (2). В настоящее время не существует терапии для этих ослепляющих заболеваний.

Генная терапия является многообещающей для лечения IRD. Среди доступных векторов для переноса генов гены, основанные на малом аденоассоциированном вирусе (AAV), являются наиболее эффективными в нацеливании как в PR, так и в пигментный эпителий сетчатки (RPE) (3-4) для долговременного лечения с одиночным субретинальным введением (3-4). Недавно авторы изобретения и другие авторы продемонстрировали, что субретинальное введение AAV хорошо переносилось и было эффективно для улучшения зрения у пациентов, пораженных LCA типа 2, который вызван мутациями в RPE65, гене, экспрессируемом в RPE (5-9). Эти результаты в целом предвещают лечение других форм LCA и IRD. Доступность серотипов вектора AAV, таких как AAV2/8, который эффективно нацеливает в PR (10-14) и RPE, дополнительно подтверждает этот подход. Однако главным ограничением AAV является его грузоемкость, которая, как считается, ограничена приблизительно 5 т.н., размер родительского вирусного генома (15-19). Это ограничивает применение подходов с AAV генной терапией общераспространенных IRD, которые вызваны мутациями в генах, кодирующая последовательность (CDS) которых составляет больше чем 5 т.н. (в данном документе называются большие гены). Это включает в себя

ЗАБОЛЕВАНИЕ	ГЕН	CDS	ЭКСПРЕССИЯ
Болезнь Штаргардта	ABCA4	6,8 т.н.	PR палочек и колбочек
Ушера 1В	MYO7A	6,7 т.н.	RPE и PR
Амавроз Лебера 10	CEP290	7,5 т.н.	В основном PR (панретинальный)
Ушера 1D, Внесиндромная глухота, аутосомно-рецессивная (DFNB12)	CDH23	10,1 т.н.	PR
Пигментный ретинит	EYS	9,4 т.н.	PR ECM
Ушера 2А	USH2a	15,6 т.н.	PR палочек и колбочек
Ушера 2С	GPR98	18,0 т.н.	В основном PR
Синдром Альстрема	ALMS1	12,5 т.н.	PR палочек и колбочек

Болезнь Штаргардта (STGD; MIM#248200) является наиболее распространенной формой наследственной макулярной дегенерации, вызванной мутациями в гене ABCA4 (CDS: 6822 п.о.), который кодирует переносчик полностью-транс-ретинала, расположенный в наружном сегменте PR (20); синдром Ушера типа 1В (USH1B; MIM#276900) является наиболее тяжелой формой RP и глухоты, вызванных мутациями в гене MYO7A (CDS: 6648 п.о.) (21), кодирующем необычный MYO7A, основанный на актиновом моторе, экспрессируемом как в PR, так и в RPE внутри сетчатки (22-24).

Палочко-колбочковая дистрофия типа 3, желтопятнистая абитрофия сетчатки, связанная с возрастом макулярная дегенерация типа 2, тяжелая сетчаточная дистрофия с ранним началом и пигментный ретинит типа 19 также ассоциированы с мутациями ABCA4 (ABCA4-ассоциированные заболевания).

Исследовали различные стратегии для преодоления ограничения грузоемкости AAV. Несколько групп, включая авторов изобретения, предпринимали попытки "принудительно вместить" большие гены в один из многих капсидов AAV, доступных посредством создания так называемых векторов увеличенного размера (25-27). Хотя введение векторов AAV увеличенного размера достигает терапевтически релевантных уровней экспрессии трансгена в моделях грызунов и собачьих моделях человеческих наследственных заболеваний (27-30), включая сетчатку, Abca4-/- и shaker 1 (sh1) мышиные модели STGD и USH1B (27, 30), механизм, лежащий в основе увеличенного размера AAV-опосредованной трансдукции,

остается неясным. В противоположность тому, что авторы изобретения и другие авторы первоначально предположили (25-27), AAV векторы увеличенного размера не содержат чистую популяцию интактных геномов большого размера, а скорее содержат гетерогенную смесь главным образом укороченных геномов ≤ 5 т.н. в длину (15-18). После инфекции повторная сборка этих укороченных геномов в ядре клетки-мишени была предположена в качестве механизма трансдукции AAV вектора увеличенного размера (15-17, 31). Независимо от механизма трансдукции и *in vivo* эффективности гетерогенность в размерах AAV генома увеличенного размера является главным ограничением для их применения в человеческой генной терапии.

Альтернативно, присущая способность AAV геномов подвергаться межмолекулярной конкатемеризации (32) задействована для переноса больших генов *in vivo* разбиением большой генной экспрессионной кассеты на половины (размером < 5 т.н.), каждая из которых содержалась в одном из двух отдельных (двойных) AAV векторов (33-35). В двойной AAV транс-сплайсинг стратегии сигнал донора сплайсинга (SD) помещен в 3'-конец 5'-половины вектора, и сигнал акцептора сплайсинга (SA) помещен в 5'-конец 3'-половины вектора. При коинфицировании одной и той же клетки двойными AAV векторами и опосредованной инвертированным терминальным повтором (ITR) конкатемеризации голова к хвосту двух половин транс-сплайсинг приводит в результате к продуцированию зрелой мРНК и полноразмерного белка (33). Транс-сплайсинг был успешно использован для экспрессирования больших генов в мышце и сетчатке (36-37).

В частности, Reich et al. (37) использовали стратегию транс-сплайсинг а с капсидами AAV2 и AAV5 и продемонстрировали, что оба вектора вызывают трансдукцию как пигментного эпителия сетчатки, так и фоторецепторов с применением гена LacZ в качестве репортерного гена. Эта стратегия не была применена с использованием терапевтического и/или большого гена.

Альтернативно, две половины большой экспрессионной трансгенной кассеты, содержащиеся в двойных AAV векторах, могут содержать гомологичные перекрывающиеся последовательности (на 3' конце 5'-половинный вектор и на 5' конце 3'-половинный вектор, двойные AAV перекрывающиеся), которые опосредуют воссоздание одиночного большого генома гомологичной рекомбинацией (34). Эта стратегия зависит от рекомбиногенных свойств трансгенных перекрывающихся последовательностей (38). Третья двойная AAV стратегия (гибридная) основана на добавлении чрезвычайно рекомбиногенной области из экзогенного гена [т.е. щелочной фосфатазы, AP (35, 39)] в транс-сплайсинг овый вектор. Добавленная область помещена после SD сигнала в 5'-половине вектора и перед SA сигналом в 3'-половине вектора для того, чтобы увеличить рекомбинацию между двойными AAV.

Документ US 2010/003218 направлен на основанную на AP гибридную систему из двойного вектора. Документ демонстрирует эффективность трансдукции основанного на AP гибридного двойного вектора, экспрессирующего мини-дистрофии, но нет данных, касающихся эффективности.

Lopes et al. (30) исследовали сетчаточную генную терапию, с кДНК большого MYO7A с использованием аденоассоциированного вируса и обнаружили, что MYO7A терапия с одиночными векторами AAV2 или AAV5 является действенной в некоторой степени, тогда как было доказано, что двойной AAV2 подход являлся менее эффективным.

Следовательно, все еще имеет место потребность в конструктах и векторах, которые могут быть задействованы для воссоздания экспрессии большого гена для эффективной генной терапии.

Указание источников финансирования.

Это изобретение было осуществлено при поддержке Italian Telethon Foundation (грант TGM11MT1 и Европейские фонды). Italian Telethon Foundation имеет права в этом изобретении.

Исследования двойных AAV транс-сплайсинг и двойных AAV гибридных стратегий с AP были осуществлены при поддержке правительства США под контрактом No. R24RY019861, присужденным Национальным институтом глаза. Правительство США имеет некоторые права в этом изобретении.

Краткая сущность изобретения

Сетчаточная генная терапия с аденоассоциированными вирусными (AAV) векторами является безопасной и эффективной для людей. Однако грузоемкость AAV, ограниченная 5 т.н., исключает его применение для терапий таких наследственных сетчаточных заболеваний, как болезнь Штаргардта (STGD) или синдром Ушера типа IB (USH1B), которые обусловлены мутациями генов, превышающих 5 т.н.. Предшествующие способы для переноса больших генов, тестированные в сетчатке и основанные на "принудительной" упаковке больших генов в AAV капсиды (AAV увеличенного размера) могут не быть легко применимы в клинической области из-за гетерогенности размера генома вектора, что представляет собой заботу о безопасности.

Используя преимущество AAV, заключающееся в способности подвергаться межмолекулярной конкатемеризации, авторы изобретения создали двойные векторы AAV, которые воссоздают большой ген или посредством сплайсинга (транс-сплайсинг), гомологичной рекомбинации (перекрывающиеся) или комбинацией двух (гибридные).

Для определения того, какая основанная на AAV стратегия наиболее эффективно трансдуцирует большие гены в сетчатке, авторы изобретения сравнили несколько основанных на AAV стратегий сторона к стороне в клетках HEK293 и в сетчатке мыши и свиньи *in vivo* с использованием EGFP, ABCA4 или

MYO7A.

Авторы изобретения обнаружили, что двойные транс-сплайсинг и гибридные, но не перекрывающиеся AAV векторы трансдуцируют эффективно мышинные и свиные фоторецепторы, главную клеточную мишень для лечения наследственных сетчаточных дегенерации. Уровни сетчаточной трансдукции посредством двойного транс-сплайсинг а или гибридного AAV приводили в результате к значительному улучшению фенотипа Abca4-/- и sh1 мышинных моделей STGD и USH1B. Двойные AAV транс-сплайсинг или гибридные векторы представляют привлекательную стратегию для генной терапии сетчаточных заболеваний, для которых требуется доставка больших генов.

Следовательно, вариант осуществления данного изобретения является системой с двойным конструктором для экспрессирования кодирующей последовательности гена, представляющего интерес, в клетке-хозяина, при этом указанная кодирующая последовательность состоит из участка 5'-конца и участка 3'-конца, содержащего:

первую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность промотора;

участок 5' конца указанной кодирующей последовательности, при этом указанный участок 5'-конца функционально связан с и находится под контролем указанного промотора;

последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга; и

последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'- ITR); и

вторую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга;

3'-конец указанной кодирующей последовательности;

сигнал полиаденилирования последовательности нуклеиновой кислоты; и

последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'-ITR).

Предпочтительным вариантом осуществления данного изобретения является система двойного конструктора для экспрессирования кодирующей последовательности гена, представляющего интерес, в клетке-хозяина, при этом указанная кодирующая последовательность состоит из участка 5'-конца и участка 3'-конца, содержащих:

первую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность промотора;

участок 5'-конца указанной кодирующей последовательности, при этом указанный участок 5'-конца функционально связан с и находится под контролем указанного промотора;

последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга; и

последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'- ITR); и

вторую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга;

3'-конец указанной кодирующей последовательности;

сигнал полиаденилирования последовательности нуклеиновой кислоты; и

последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'- ITR),

при этом при введении указанной первой плазмиды и указанной второй плазмиды в клетку-хозяина, указанная кодирующая последовательность воссоздается посредством донорного сигнала сплайсинга и акцепторного сигнала сплайсинга. Система двойного конструктора по данному изобретению преимущественно задействована для воссоздания экспрессии большого гена. Когда кодирующая последовательность воссоздается, происходит экспрессия гена.

Предпочтительно, указанная первая плазида и указанная вторая плазида дополнительно содержат последовательность нуклеиновой кислоты рекомбиногенной области в 5' положении 3'-ITR и в 3' положении 5'-ITR соответственно.

Более предпочтительно рекомбиногенная область является рекомбиногенной областью фага F1.

Еще предпочтительней последовательность нуклеиновой кислоты рекомбиногенной области, по существу, состоит из последовательности

GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA

ACGCGAATTTTAACAAAAAT (SEQ ID NO. 3).

Рекомбиногенная область может также являться фрагментом SEQ ID NO.3, при этом указанный фрагмент сохраняет рекомбиногенные свойства полноразмерной последовательности. Предпочтительно фрагмент имеет 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности с SEQ ID NO. 3.

Еще предпочтительней нуклеотидная последовательность ITR происходит из одинакового или различного серотипа AAV.

Предпочтительно, 3'-ITR первой плазмиды и 5'-ITR второй плазмиды происходят из одинакового

серотипа AAV.

Еще более предпочтительно 5'-ITR и 3'-ITR первой плазмиды и 5'-ITR и 3'-ITR второй плазмиды соответственно происходят из разных серотипов AAV.

Предпочтительно, 5'-ITR первой плазмиды и 3'-ITR второй плазмиды происходят из разных серотипов AAV.

Еще более предпочтительно кодирующая последовательность разделена на участок 5' конца и участок 3' конца в естественном экзон-экзонном соединении.

В предпочтительном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга, по существу, состоит из последовательности

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGA

GACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT (SEQ ID No. 1).

В предпочтительном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга по существу состоит из последовательности

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ

ID No. 2).

Акцепторный сигнал сплайсинга и донорный сигнал сплайсинга может также быть выбран специалистом в данной области из последовательностей, известных в данной области.

Сплайсосомные интроны часто находятся внутри последовательностей, кодирующих эукариотические белки генов. Внутри интрона донорный сайт (5' конец интрона), сайт ветви (рядом с 3' концом интрона) и акцепторный сайт (3' конец интрона) необходимы для сплайсинга. Сплайсинговый донорный сайт включает в себя почти инвариантную последовательность GU на 5' конце интрона внутри большей, менее консервативной области. Акцепторный сайт сплайсинга в 3' конце интрона терминирует интрон с почти инвариантной AG последовательностью. Перед (5'-выступ) от AG имеется область с высоким содержанием пиримидинов (C и U) или полипиримидиновый тракт. Перед полипиримидиновым трактом имеется точка ветвления, которая включает в себя адениновый нуклеотид.

В предпочтительном варианте осуществления первая плазида дополнительно содержит по меньшей мере одну энхансерную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью. Любая известная пригодная энхансерная последовательность может быть выбрана специалистом в данной области.

Предпочтительно кодирующая последовательность является нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, способный корректировать генетическое заболевание, в частности наследственную дегенерацию сетчатки.

Еще предпочтительней кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из ABCA4, MYO7A, CEP290, CDH23, EYS, USH2a, GPR98 или ALMS1.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является двойная вирусная векторная система, содержащая

первый вирусный вектор, содержащий первую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении: последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR), последовательность промотора, участок 5' конца указанной кодирующей последовательности, при этом указанный участок 5'-конца функционально связан с и находится под контролем указанного промотора, последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга и последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'-ITR); и

второй вирусный вектор, содержащий вторую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении: последовательность 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR), последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга, 3'-конец указанной кодирующей последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты сигнала полиаденилирования; и последовательность 3'-инвертированного терминального повтора (3'-ITR).

Предпочтительно векторы являются аденоассоциированными вирусными (AAV) векторами.

Еще предпочтительней аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы выбраны из одинаковых или различных серотипов AAV.

Еще предпочтительней аденоассоциированный вирус выбран из серотипа 2, 8, 5, 7 или 9.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяина, трансформированная двойной вирусной векторной системой в соответствии с изобретением.

Предпочтительно клетка-хозяина является клеткой млекопитающего, человеческой клеткой, сетчаточной клеткой, незембриональной стволовой клеткой.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является система с двойным конструктом по изобретению, система с двойным вирусным вектором по изобретению или клетка-хозяина по изобретению для медицинского использования, предпочтительно для использования в генной терапии, еще предпочтительней для лечения и/или предотвращения патологии или заболевания, характеризующихся дегенерацией сетчатки. Предпочтительно, сетчаточная дегенерация является наследственной.

Еще предпочтительней патология или заболевание выбраны из группы, состоящей из пигментного ретинита, амавроза Лебера (LCA), болезни Штаргардта, заболевания Ушера, синдрома Альстрема, заболевания, вызванного мутацией в гене ABCA4 (также называемом ABCA4-ассоциированное заболевание). Палочко-колбочковая дистрофия типа 3, желтопятнистая абитрофия сетчатки, связанная с возрастом макулярная дегенерация типа 2, тяжелая сетчаточная дистрофия с ранним началом и Пигментный ретинит типа 19 являются примерами заболевания, вызванного мутацией в гене ABCA4 (ABCA4-ассоциированные заболевания).

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая систему с двойным конструктором в соответствии с изобретением, систему с двойным вирусным вектором в соответствии с изобретением или клетку-хозяина в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является способ лечения и/или предотвращения патологии или заболевания, характеризующихся сетчаточной дегенерацией, содержащий введение объекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества системы с двойным конструктором, как описано в данном документе, системы с двойным вирусным вектором, как описано в данном документе, или клетки-хозяина, как описано в данном документе.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, состоящая из SEQ ID No. 3, для использования в качестве рекомбинантной области.

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является способ для индуцирования генетической рекомбинации, содержащий использование последовательности, состоящей из SEQ ID No. 3.

В данном изобретении промотор предпочтительно выбран из группы, состоящей из промотора цитомегаловируса, промотора родопсина, промотора родопсинкиназы, промотора межфоторецепторного ретинол-связывающего белка, промотора вителлиформной макулярной дистрофии 2. Однако может быть использован любой пригодный промотор, известный в данной области.

В данном изобретении кодирующая последовательность разделена на первый и второй фрагмент (участок 5' конца и 3' конец участок) в естественном экзон-экзонном соединении. Предпочтительно каждый фрагмент кодирующей последовательности не должен превышать размер 10 т.н. Предпочтительно каждый участок 5' конца и участок 3' конца может иметь размер 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 т.н. или меньший размер.

В последнее десятилетие генная терапия была применена для лечения заболевания в сотнях клинических испытаний. Были разработаны различные средства для доставки генов в человеческие клетки; среди них в настоящее время среди наиболее популярных средств для генной доставки - генетически сконструированные вирусы, включая аденовирусы. Большинство систем содержат векторы, которые способны к включению в себя генов, представляющих интерес, и клетки-хелперы, которые могут обеспечить вирусные структурные белки и ферменты для позволения генерации содержащих вектор инфекционных вирусных частиц. Аденоассоциированный вирус является семейством вирусов, которые отличаются по нуклеотидной и аминокислотной последовательности, структуре генома, патогенности и кругу хозяев. Это разнообразие предоставляет возможности использования вирусов с различными биологическими характеристиками для разработки различных терапевтических применений. Как и в случае любого средства доставки, эффективность, способность для нацеливания в некоторую ткань или клеточный тип, экспрессия гена, представляющего интерес, и безопасность основанных на аденовирусе систем являются важными для успешного применения генной терапии. Значительные усилия были направлены на эти области исследования в последние годы. Различные модификации были осуществлены по отношению к основанным на аденоассоциированном вирусе векторам и клеткам-хелперам для изменения генной экспрессии, доставки мишени, улучшения вирусных титров и увеличения безопасности. Данное изобретение представляет улучшение в этом процессе конструирования, в котором оно действует для эффективной доставки генов, представляющих интерес, в таких вирусных векторах.

Вирусы являются логическими средствами для генной доставки. Они реплицируются внутри клетки и, следовательно, задействуют механизмы для проникновения в клетки и использование клеточного аппарата для экспрессирования их генов. Концепция основанная на вирусе генной доставки заключается в конструировании вируса так, что он может экспрессировать ген, представляющий интерес. В зависимости от специфического применения и типа вируса большинство вирусных векторов содержат мутации, которые препятствуют их способности реплицироваться свободно в виде вирусов дикого типа в хозяине. Вирусы из нескольких различных семейств были модифицированы для генерирования вирусных векторов для генной доставки. Эти вирусы включают в себя ретровирусы, лентивирус, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы простого герпеса, пикорнавирусы и альфавирусы. Данное изобретение предпочтительно задействует аденоассоциированные вирусы.

Идеальный основанный на аденоассоциированном вирусе вектор для генной доставки должен быть эффективным, специфичным к клетке, регулируемым и безопасным. Эффективность доставки важна потому, что она может определять эффективность терапии. Усилия в настоящее время нацелены на достижение специфичной к клеточному типу инфекции и генную экспрессию с аденоассоциированными вирусными векторами. В дополнение, разрабатываются аденоассоциированные вирусные векторы для регу-

лирования экспрессии гена, представляющего интерес, так как для терапии может требоваться долгосрочная или регулируемая экспрессия. Безопасность является главной проблемой для вирусной генной доставки из-за того, что большинство вирусов являются или патогенами или имеют патогенный потенциал. Важно, чтобы во время генной доставки, пациент также не получил непреднамеренно патогенный вирус, который имеет полный репликационный потенциал.

Аденоассоциированный вирус (AAV) является маленьким вирусом, который инфицирует людей и некоторые другие виды приматов. В настоящее время неизвестно, чтобы AAV вызывал заболевание, и, следовательно, вирус вызывает очень мягкий иммунный ответ. В генной терапии с использованием AAV могут инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки и оставаться в экстрахромосомном состоянии без интегрирования в геном клетки-хозяина. Эти свойства делают AAV очень привлекательным кандидатом для создания вирусных векторов для генной терапии и для создания изогенных человеческих моделей заболевания.

AAV дикого типа привлек большой интерес у исследователей генной терапии из-за ряда свойств. Главным среди этих свойств является наблюдаемое отсутствие патогенности у вируса. Он может также инфицировать неделящиеся клетки и имеет способность стабильно интегрироваться в геном клетки-хозяина в специфическом сайте (обозначенном AAVS1) в человеческой хромосоме 19. Это свойство делает его в некоторой степени более предсказуемым, чем ретровирусы, которые представляют угрозу случайной вставки и мутагенеза, после чего иногда следует развитие рака. Геном AAV интегрируется наиболее часто в упомянутый сайт, тогда как случайные включения в геном происходят с пренебрежимо малой частотой. Развитие AAV в качестве векторов для генной терапии, однако, исключило эту интеграционную способность удалением *тер* и *сар* из ДНК вектора. Требуемый ген вместе с промотором для направления транскрипции гена встроен между инвертированными терминальными повторами (ITR), которые способствуют образованию конкатомера в ядре после того, как одноцепочечный ДНК вектор превращен комплексами ДНК полимеразы клетки-хозяина в двухцепочечную ДНК. Основанные на AAV векторы для генной терапии формируют эписомальный конкатомер в ядре клетки-хозяина. В неделящихся клетках эти конкатомеры остаются интактными для жизни клетки-хозяина. В делящихся клетках ДНК AAV потеряна посредством клеточного деления, так как эписомальная ДНК не реплицируется вместе с ДНК клетки-хозяина. Случайное интегрирование AAV ДНК в геном хозяина является обнаруживаемым, но происходит с очень низкой частотой. AAV также представляют очень низкую иммуногенность, по-видимому, ограниченной генерацией нейтрализующих антител, при этом они не индуцируют очевидно определенный цитотоксический ответ. Это свойство вместе со способностью инфицировать покоящиеся клетки представляет их преобладание над аденовирусами в качестве векторов для человеческой генной терапии.

Геном, транскриптом и протеом AAV.

Геном AAV состоит из одноцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоты (оцДНК) или смысловой, или антисмысловой, которая имеет около 4,7 тысяч оснований в длину. Геном содержит инвертированные терминальные повторы (ITR) на обоих концах ДНК цепи и две открытые рамки считывания (ORF): *тер* и *сар*. Первая составлена из четырех перекрывающихся генов, кодирующих белки Rep, необходимые для жизненного цикла AAV, и последняя содержит перекрывающиеся нуклеотидные последовательности капсидных белков: VP1, VP2 и VP3, которые взаимодействуют друг с другом с формированием капсида икосаэдрической симметрии.

Последовательности ITR.

Последовательности инвертированного терминального повтора (ITR) содержат 145 оснований каждая. Они были названы так из-за их симметрии, которая, как было продемонстрировано, была необходима для эффективного мультиплицирования AAV генома. Другим свойством этих последовательностей является их способность формировать шпильку, что вносит вклад в так называемое самопримирование, что позволяет независимый от праймазы синтез второй ДНК цепи. ITR также, как было продемонстрировано, были необходимы как для интегрирования ДНК AAV в геном клетки-хозяина (19-я хромосома у людей) и его высвобождения, а также для эффективного инкапсулирования ДНК AAV, комбинированного с генерацией полностью собранных, устойчивых к дезоксирибонуклеазе AAV частиц.

Применительно к генной терапии ITR, по-видимому, являются единственными последовательностями, требуемыми *in cis* после терапевтического гена: структурные (*сар*) и упаковочные (*тер*) гены могут быть доставлены *in trans*. С этим допущением многие способы были адаптированы для эффективного продуцирования рекомбинантных AAV (rAAV) векторов, содержащих репортерный или терапевтический ген. Однако также было опубликовано, что ITR не являются единственными элементами, требуемыми *in cis* для эффективной репликации и инкапсулирования. Несколько исследовательских групп идентифицировали последовательность, обозначенную *cis*-acting Rep-dependent element (CARE), внутри кодирующей последовательности гена *тер*. CARE, которая, как было продемонстрировано, увеличивала репликацию и инкапсулирование, когда она была представлена *in cis*.

По данным на 2006 год были описаны 11 AAV серотипов, 11-й в 2004. Все известные серотипы могут инфицировать клетки из множества различных типов ткани. Тканевая специфичность определяется серотипом капсида, и псевдотипирование AAV векторов для изменения их диапазона тропизма, вероят-

но, будет важным для их использования в терапии. В данном изобретении предпочтительными являются ITR AW серотипа 2 и серотипа 5.

Серотип 2.

Серотип 2 (AAV2) в настоящее время наиболее тщательно исследован. AAV2 представляет естественный тропизм в отношении скелетных мышц, нейронов, клеток и гепатоцитов.

Три клеточных рецептора были описаны для AAV2: гепарансульфатный протеогликан (HSPG), интегрин $\alpha_v\beta_3$ и рецептор 1 фактора роста фибробластов (FGFR-1). Первый функционирует в качестве первичного рецептора, тогда как последние два имеют корецепторную активность и позволяют AAV проникновение в клетку рецептор-опосредованным эндоцитозом. Эти результаты исследования оспаривались Qiu, Handa et al. HSPG функционирует в качестве первичного рецептора несмотря на то, что его избыток во внеклеточном матриксе может захватывать AAV частицы и ослаблять инфекционную эффективность.

Серотип 2 и рак.

Исследования продемонстрировали, что серотип 2 вируса (AAV-2), по всей видимости, уничтожает раковые клетки без причинения вреда для здоровых клеток. "Наши результаты предполагают, что аденоассоциированный вирус типа 2, который инфицирует большую часть популяции, но не имеет эффекта на здоровые клетки", указал Craig Meyers, профессор иммунологии и микробиологии в Penn State College of Medicine в Пенсильвании. Это могло привести к новому противораковому агенту.

Другие серотипы.

Хотя AAV2 является наиболее распространенным серотипом в различных основанных на AAV исследованиях, было продемонстрировано, что другие серотипы могут быть более эффективными в качестве векторов для генной доставки. К примеру, AAV6 является намного лучшим в инфицировании дыхательных путей эпителиальных клеток, AAV7 представляет очень высокий уровень трансдукции мышечных скелетных мышечных клеток (аналогично AAV1 и AAV5), AAV8 является превосходным в трансдукции гепатоцитов, и AAV1 и 5, как было продемонстрировано, являются очень эффективным в генной доставке в васкулярные эндотелиальные клетки. В мозге большинство серотипов AAV демонстрируют нейрональный тропизм, тогда как AAV5 также трансдуцирует астроциты. AAV6, гибрид AAV1 и AAV2, также демонстрирует более низкую иммуногенность, чем AAV2.

Серотипы могут отличаться по рецепторам, с которыми они связаны. Например, трансдукция AAV4 и AAV5 может быть ингибирована растворимыми сиаловыми кислотами (различными формами для каждого из этих серотипов), и AAV5, как было продемонстрировано, проникает в клетки посредством рецептора тромбоцитарного фактора роста.

В данном изобретении доставляющие носители по данному изобретению могут быть введены пациенту. Квалифицированный работник будет способен определить подходящие интенсивности дозировок. Термин "введенный" включает в себя доставку вирусными или невирусными технологиями. Механизмы вирусной доставки включают в себя, но не ограничены ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, герпесные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и бакуловирусные векторы и т.д., как описано выше. Механизмы невирусной доставки включают в себя липид-опосредованную трансфекцию, липосомы, иммунолипосомы, липофектин, катионные поверхностные амфифильные вещества (CFA) и их комбинации.

Доставка одного или более терапевтических генов векторной системой в соответствии с данным изобретением может быть использована отдельно или в комбинации с другими лечениями или компонентами лечения.

Данное изобретение также предоставляет фармацевтическую композицию для лечения индивидуума генной терапией, в котором композиция содержит терапевтически эффективное количество вектора/конструкта или клетки-хозяина по данному изобретению, содержащих один или более доставляемых терапевтических и/или диагностических трансгенов или вирусную частицу, продуцированную или полученную из того же. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для использования по отношению к человеку или животному. Как правило, врач определит фактическую дозировку, которая будет наиболее пригодна для индивидуального объекта, и она будет варьироваться с возрастом, весом и ответом конкретного индивидуума. Композиция может необязательно содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант. Выбор фармацевтического носителя, вспомогательного вещества или разбавителя может быть осуществлен, принимая во внимание подразумеваемый путь введения и стандартное фармацевтическое применение на практике. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в добавление к носителю, вспомогательному веществу или разбавителю любое пригодное связующее вещество(а), смазывающее вещество(а), суспендирующий агент(ы), покрывающий агент(ы), солибилизирующий агент(ы) и другие несущие агенты, которые могут содействовать или увеличивать вирусное проникновение в целевой сайт (такие как, например, липидная система доставки). Когда это целесообразно, фармацевтические композиции могут быть введены в виде любого одного или более из: ингаляции, в форме суппозитория или пессария, местно в форме лосьона, раствора, крема, мази или порошка для присыпки, посредством использования кожного пла-

стыря, орально в форме таблеток, содержащих вспомогательные вещества, такие как крахмал или лактоза или в капсулах, или яйцеклетках, или отдельно, или в виде примеси со вспомогательными веществами или в форме эликсиров, растворов или суспензий, содержащих ароматизирующие или окрашивающие агенты, или они могут быть инъецированы парентерально, например, интракавернозно, внутривенно, внутримышечно или подкожно. Для парентерального введения наилучшим образом композиции могут быть использованы в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или моносахаридов для того, чтобы сделать раствор изотоническим с кровью. Для буккального или подъязычного введения композиции могут быть введены в форме таблеток или леденцов, которые могут быть составлены общепринятым образом.

Специалист в данной области хорошо осведомлен о стандартных способах инкорпорирования полинуклеотида или вектора в клетку-хозяина, например, трансфекция, липофекция, электропорация, микроинъекция, вирусная инфекция, температурный шок, трансформация после химической пермеабиллизации мембраны или клеточного слияния.

Как использовано в данном документе, термин "клетка-хозяина или генетически сконструированная клетка-хозяина" относится к клеткам-хозяина, которые были трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы с конструктом или вектором, описанным ранее.

В качестве иллюстративных примеров подходящих клеток-хозяина, могут быть упомянуты бактериальные клетки, такие как *E.coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, грибковые клетки, такие как дрожжи, клетки насекомых, такие как Sf9, животные клетки, такие как CHO или COS, растительные клетки и т.д. Предполагается, что выбор подходящего хозяина находится в рамках компетенции специалиста в данной области, исходя из идей данного изобретения. Предпочтительно, указанная клетка-хозяина является животной клеткой и наиболее предпочтительно человеческой клеткой.

Изобретение дополнительно предоставляет клетку-хозяина, содержащую любой рекомбинантный экспрессионный вектор, описанный в данном документе. Клетка-хозяина может являться культивируемой клеткой или первичной клеткой, т.е. выделенной непосредственно из организма, например человека. Клетка-хозяина может являться адгезивной клеткой или суспендированной клеткой, т.е. клеткой, которая растет в суспензии. Пригодные клетки-хозяина известны в данной области и включают в себя, к примеру, DH5a, клетки *E.coli*, клетки яичника китайского хомячка клетки, обезьяны клетки VERO, клетки COS, клетки HEK293 и тому подобное.

Данное изобретение далее будет проиллюстрировано посредством неограничивающих примеров со ссылками на следующие чертежи.

Фиг. 1 - схематическое отображение основанных на AAV стратегий трансдукции большого гена.

CDS: кодирующая последовательность; pA: сигнал полиаденилирования; SD: донорный сигнал сплайсинга; SA: акцепторный сигнал сплайсинга; AP: рекомбиногенная область щелочной фосфатазы (39); AK: рекомбиногенная область фага F1. Пунктирные линии демонстрируют сплайсинг, происходящий между SD и SA, точечные линии демонстрируют перекрывающиеся области, доступные для гомологичной рекомбинации. Авторы изобретения обнаружили, что двойные транс-сплайсинг и гибридные АК могут быть использованы для успешного воссоздания экспрессии большого гена. В частности, двойные транс-сплайсинг и гибридные АК векторы, но не перекрывающиеся и гибридные AP векторы, трансдуцируют эффективно мышинные и свиные фоторецепторы. Векторные AAV плазмиды нормального и увеличенного размера содержали полноразмерные экспрессионные кассеты, включая промотор, полноразмерный трансген CDS и сигнал полиаденилирования (pA) (таблица). Две отдельные AAV векторные плазмиды (5' и 3'), требуемые для генерирования двойных AAV векторов, содержали или промотор с последующим N-терминальным участком трансгена CDS (5' плазида), или C-терминальный участок трансгена CDS с последующим pA сигналом (3' плазида, таблица). Структура всех плазмид приведена в разделе "материал и способ";

фиг. 2 - двойные AAV перекрывающиеся, транс-сплайсинг и гибридные АК векторы эффективно трансдуцируют большие гены *in vitro*.

Вестерн-блоттинг клеток HEK293, инфицированных с AAV2/2 векторами, кодирующими EGFP (A и D), ABCA4 (B и E) и MYO7A (C и F). (с A по C) Стрелки указывают полноразмерные белки, нагруженные микрограммы белков отображены под каждой дорожкой, маркер молекулярного веса отображен слева. (с D по F) Количественное определение белковых полос EGFP (D), ABCA4 (E) и MYO7A (F). Интенсивность EGFP, ABCA4 и MYO7A полос была поделена на интенсивности полос тубулина (D) или филамина (E-F). Гистограммы демонстрируют экспрессию белков в виде процентного содержания, соответствующего двойным AAV транс-сплайсинг (TS) векторам, средняя величина отображена выше соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего). (A-C) Изображения Вестерн-блоттинга являются иллюстративными, и количественные определения составлены из $n=4$ (A-B) или $n=3$ (C) независимых экспериментов. OZ: AAV увеличенного размера; OV: двойные перекрывающиеся AAV; TS: двойные AAV транс-сплайсинг; AP: двойные AAV гибридные AP; АК: двойные AAV гибридные АК; 5'+3': клетки, инфицированные совместно с 5'- и 3'-половинными векторами; 5': контрольные клетки, инфицированные только с 5'-половинным вектором только; 3': контрольные

клетки, инфицированные только с 3'-половиной; α -EGFP: антитело анти-EGFP; α -3xflag: антитело анти-3xflag; α -MYO7A: антитело анти-MYO7A; α - β -тубулин: антитело анти- β -тубулин; α -филамин: антитело антифиламин. * величина ANOVA $p < 0,05$; ** величина ANOVA $p < 0,001$. (F) Звездочки, отображенные на расположенной ниже панели, представляют значительные различия как с OZ, так и с AP;

фиг. 3 - двойные AAV перекрывающиеся векторы трансдуцируют RPE, но не фоторецепторы в мышины и свиной сетчатке.

Вестерн-блот анализ C57BL/6 (A) и сетчаточных лизатов крупных белых свиней (B) через один месяц после инъекции AAV2/8 двойных AAV перекрывающихся векторов, кодирующих ABCA4-3xflag (OV) или AAV2/8 векторов, кодирующих EGFP (EGFP) нормального размера под контролем убиквитарного промотора цитомегаловируса (CMV), промоторами PR-специфичного родопсина (RHO) и родопсинкиназы (RHOК) или промотора RPE-специфичной вителлиформной макулярной дистрофии 2 (VMD2). (A-B) Стрелки указывают полноразмерные белки, маркер молекулярного веса отображен слева, 150 мкг белков нагружали в каждую полосу. Количество (n) и процентное содержание ABCA4-позитивных сетчаток из общего числа анализируемых сетчаток отображено; α -3xflag: антитело анти-3xflag; α -дисферлин: антитело антидисферлин (C) Вестерн-блот анализ на C57/BL6 глазных чаш (левая панель) и сетчаток (правая панель) через 3 месяца после инъекции AAV2/8 перекрывающимися векторами, кодирующими MYO7A-NA (OV) под контролем промотора убиквитарного куриного β -актина (CBA) или промотора специфичного к фоторецептору родопсина (RHO). Стрелка указывает на полноразмерные белки, маркер молекулярного веса отображен слева, 100 мкг белка нагружали в каждую полосу. Отображено количество (n) и процентное содержание MYO7A позитивных сетчаток из общего числа анализируемых сетчаток. α -НА: антитело антигемоглобин (НА);

фиг. 4 - двойные AAV транс-сплайсинг и гибридные АК векторы эффективно трансдуцируют как RPE, так и фоторецепторы.

Флуоресцентный анализ сетчаточных криосрезов из мышей C57BL/6 через один месяц после субретинальной инъекции векторов AAV2/8, кодирующий EGFP под контролем промотора убиквитарного цитомегаловируса (CMV). Масштабная полоска (20 мкм) отображена на фигуре. NS: AAV нормальный размер; OZ: AAV увеличенный размер; TS: двойные AAV транс-сплайсинг; AP: двойные AAV гибридные AP; АК: двойные AAV гибридные АК; RPE: сетчаточный пигментный эпителий; ONL: наружный ядерный слой;

фиг. 5 - двойные AAV транс-сплайсинг и гибридные АК эффективно трансдуцируют мышинные и свиные фоторецепторы.

(A) Флуоресцентный анализ сетчаточных криосрезов из мышей C57BL/6 через один месяц после субретинальной инъекции векторов AAV2/8, кодирующих EGFP под контролем PR-специфичного промотора родопсина (RHO). Масштабная полоска (20 мкм) отображена на фигуре. (B) Флуоресцентный анализ сетчаточных криосрезов крупных белых свиней через один месяц после субретинальной инъекции векторов AAV2/8, кодирующих EGFP под контролем PR-специфичного RHO промотора. На фигуре отображена масштабная полоска (50 мкм). NS: AAV нормальный размер; TS: двойные AAV транс-сплайсинг; АК: двойные AAV гибридные АК; RPE: сетчаточный пигментный эпителий; ONL: наружный ядерный слой;

фиг. 6 - результаты субретинального введения двойных AAV транс-сплайсинг и гибридных АК векторов с устойчивыми, все еще варвируемыми уровнями ABCA4 экспрессии в мышинных фоторецепторах.

(A) Вестерн-блот анализ C57BL/6 сетчаточных лизатов через один месяц после инъекции двойных AAV транс-сплайсинг (TS) и двойных AAV гибридных АК (АК) векторов, кодирующих ABCA4 под контролем PR-специфичного промотора родопсина (RHO). Стрелка указывает на полноразмерные белки, маркер молекулярного веса отображен слева, 150 мкг белка нагружали в каждую полосу. Отображено количество (n) и процентное содержание ABCA4-позитивных сетчаток из общего числа анализируемых сетчаток. 5'+3': сетчатки инъектировали совместно с 5'- и 3'-половинными векторами; α -3xflag: антитело анти-3xflag; α -дисферлин: антителом антидисферлин. (B) Анализ иммуно-электронной микроскопией с антителом анти-НА сетчаточных срезов мышей дикого типа Balb/C (WT; n=3 глаза) и Abca4-/- мышей, инъектированных с двойными AAV гибридными АК векторами (АК-ABCA4; n=5 глаза) или с AAV нормального размера EGFP (EGFP, n=3 глаза) в качестве контроля. Черные точки представляют иммунозолотое окрашивание ABCA4-НА белка. Масштабная полоска (200 нм) отображена на фигуре;

фиг. 7 - субретинальная инъекция двойных AAV гибридных АК векторов снижает накопление гранул липофусцина у Abca4-/- мышей.

(A) Анализ просвечивающей электронной микроскопией сетчаточных срезов Balb/c дикого типа (ДТ) и Abca4-/- мышей, инъектированных с или двойными AAV гибридными АК векторами (Abca4-/- АК-ABCA4) или с AAV нормального размера EGFP (Abca4-/- EGFP) в качестве контроля. Черные стрелки указывают гранулы липофусцина. Масштабная полоска (1,6 мкм) отображена на фигуре.

(B) Количественное определение среднего количества липофусциновых гранул, подсчитанное в по меньшей мере 30 областях (25 мкм²) для каждого образца. WT: мыши Balb/c; Abca4-/- EGFP/5'/3': мыши Abca4-/-, инъектированные с или AAV нормального размера EGFP, или 5' или 3' половинным вектором

двойного AAV гибридного АК, в качестве контроля; Abca4^{-/-} АК-ABCA4: мыши, инъекцированные с двойными AAV гибридными АК векторами; Abca4^{-/-} TS-ABCA4: мыши, инъекцированные с двойными AAV транс-сплайсинг векторами. Количество (n) анализируемых глаз отображено. Средняя величина отображена выше соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего). * p ANOVA < 0,05;

фиг. 8 - субретинальные инъекции двойных AAV гибридных АК векторов снижают толщину Abca4^{-/-} RPE.

(А) Иллюстративные изображения анализа просвечивающей электронной микроскопией сетчаточных срезов Balb/c дикого типа (ДТ) и Abca4^{-/-} мышей, инъекцированных с или двойными AAV транс-сплайсинг (TS-ABCA4) и гибридными АК векторами (АК-ABCA4) или с AAV нормального размера EGFP (EGFP) и 5' или 3' половинами двойных гибридных АК векторов (5'/3') в качестве контроля. Пунктирные линии указывают границы RPE клеток. Масштабная полоска (3,8 мкм) отображена на фигуре. (В) Количественное определение средней толщины RPE, подсчитанное по меньшей мере в 30 областях для каждого образца. Отображено количество (n) анализируемых глаз. Средняя величина отображена выше соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего), с.откл.с: WT: $\pm$ 716; TS-ABCA4: $\pm$ 698;

фиг. 9 - субретинальное введение двойных AAV транс-сплайсинг и гибридных АК векторов приводит в результате к устойчивой экспрессии MYO7A у мышей.

Вестерн-блот анализ C57BL/6 глазных чаш через один месяц после инъекции двойных AAV транс-сплайсинг (TS) и гибридных АК (АК) векторов, кодирующих MYO7A-НА под контролем убиквитинного промотора куриного β -актина (CBA). Стрелка указывает полноразмерные белки, маркер молекулярного веса отображен слева, в каждую полосу загружали 100 мкг белков. Отображено количество (n) и процентное содержание MYO7A-позитивных глазных чаш из общего числа анализируемых сетчаток. 5'+3': глаза, инъекцированные совместно с 5'- и 3'-половинными векторами; 5': глаза, инъекцированные с 5'-половинными векторами; 3': глаза, инъекцированные с 3'-половинными векторами; α -НА: анти-гемагглютинин (НА) антитело; α -дисферлин: антитело антидисферлин;

фиг. 10 - субретинальное введение двойных AAV транс-сплайсинг и гибридных АК векторов восстанавливает расположение меланосомы в sh1^{-/-} RPE.

(А) Иллюстративные полутонкие сетчаточные срезы, окрашенные с тканевым красителем Эпокси, sh1^{+/+} и sh1^{-/-} глаз, инъекцированных с AAV нормального размера EGFP (EGFP, n=4 глаза), и sh1^{-/-} глаз, инъекцированных с двойными AAV транс-сплайсинг (TS-MYO7A, n=3 глаза), гибридными АК (АК-MYO7A; n=3 глаза) или 5'-половинными векторами (5'TS/5'AK, n=4 глаза) в качестве контроля. На фигуре отображена масштабная полоска (10 мкм). (В) Количественное определение расположения меланосомы в RPE ворсинках sh1 мышей через два месяца после субретинальной доставки двойных AAV векторов. Количественное определение отображено в виде среднего количества апикальной меланосом/областей, средняя величина отображена сверху соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего). *p ANOVA < 0,05, **p ANOVA < 0,001;

фиг. 11 - субретинальное введение двойных AAV транс-сплайсинг и гибридных АК векторов снижает накопление родопсина в sh1^{-/-} PR соединительных ресничках.

Количественное определение числа родопсиновых золотых частиц в PR соединительной ресничке мышей sh1 через два месяца после субретинальной доставки двойных AAV векторов. Количественное определение отображено в виде среднего количества частиц золота в расчете на длину соединительных ресничек (нм), средняя величина отображена сверху соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего);

фиг. 12 - двойные AAV транс-сплайсинг и гибридные АК векторы эффективно трансдуцируют боковой ген CER290 in vitro.

Вестерн-блоттинг клеток HEK293, инфицированных с AAV2/2 векторами, кодирующими CER290, меченный на его С-конце с гемагглютининовой (НА) меткой (А-В). (А) Стрелка указывает полноразмерный белок, в каждую полосу загружали 60 мкг белков, маркер молекулярного веса отображен слева. (В) Количественное определение полос белка CER290. Интенсивности полосы CER290 были поделены на интенсивность полос филамина. Гистограмма демонстрирует экспрессию белков в виде процентного содержания соответствующих двойных AAV транс-сплайсинг (TS) векторов, средняя величина отображена сверху соответствующего столбца. Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего). Проиллюстрировано изображение Вестерн-блоттинга и количественное определение осуществлено из n=5 независимых экспериментов. OV: двойные AAV перекрывающиеся; TS: двойные AAV транс-сплайсинг; АК: двойные AAV гибридные АК; 5'+3': клетки, инфицированные совместно с 5'- и 3'-половинными векторами; 3': контрольные клетки, инфицированные только с 3'-половиной; α -НА: антитело анти-НА; α -филамин: антитело антифиламин;

фиг. 13 - улучшенное восстановление от световой десенсибилизации у мышей Abca4^{-/-} возрастом 3 месяца, подвергаемых лечению с двойными AAV транс-сплайсинг и гибридными АК векторами.

Восстановление от световой десенсибилизации у Abca4^{-/-} и мышей Balb/c через 6 недель после

инъекции. Соответствующая b-волна является соотношением между амплитудами b-волны (мкВ) после и перед десенсибилизацией, обе из которых вызваны 1 кДж/м^2 . Время (минуты) относится к времени после десенсибилизации. Отображено среднее восстановление (%) за 60 мин. р ANOVA Abca4-/- АК-ABCA4 в сравнении с Abca4-/- неинъектированными /5': 0,05; р ANOVA Abca4-/- TS-ABCA4 в сравнении с Abca4-/- неинъектированными/5': 0,009; р ANOVA Abca4-/- АК-ABCA4 в сравнении с WT: 0,002; р ANOVA Abca4-/- TS-ABCA4 в сравнении с WT: 0,02; р ANOVA WT в сравнении с Abca4-/- неинъектированными /5': 0,00001. WT: мыши Balb/c (n=4); Abca4-/-TS-ABCA4: мыши, инъектированные с двойными AAV транс-сплайсинг векторами (n=5); Abca4-/- АК-ABCA4: мыши, инъектированные с двойными AAV гибридными АК векторами (n=5); Abca4-/- неинъектированные/5': Abca4-/- мыши или неинъектированные (n=2) или инъектированные с 5' половиной двойных AAV TS или гибридных АК векторов (n=5). Данные отображены в виде $\pm$ с.о.с. (стандартная ошибка среднего). * р ANOVA<0,05;

фиг. 14 - двойные AAV гибридные АК векторы индуцируют более сильную экспрессию MYO1A, чем двойные AAV транс-сплайсинг векторы в sh1-/- фоторецепторах.

Количественное определение уровней MYO7A из двойных AAV векторов в sh1-/- глазах, соответствующих эндогенному Myo7a, экспрессируемому в sh1+/+ глазах. Sh1-/- глаза инъектировали с двойными AAV TS и гибридными АК векторами, кодирующими MYO7A под контролем промоторов или CBA (левая панель), или RHO (правая панель). Гистограммы демонстрируют экспрессию белка MYO7A в виде процентного содержания соответствующего sh1+/+ Myo7a; средняя величина отображена сверху соответствующего столбца. Количественное определение выполняли Вестерн-блот анализом с использованием анти-MYO7A антитела и измерениями MYO7A и Myo7a интенсивностей полос, нормализованных по дисферлину (данные не приведены). Планки погрешностей: среднее $\pm$ с.откл.с. (стандартное отклонение среднего). Проиллюстрировано количественное определение: i. левая панель: n=2 sh1+/+ глазные чаши и n=5 или n=1 sh1-/- глазные чаши, подвергаемые лечению с или TS-MYO7A или АК-MYO7A, соответственно; ii. правая панель: n=2 sh1+/+ сетчаток и n=1 или n=3 sh1-/- сетчаток, подвергаемых лечению с или TS-MYO7A или АК-MYO7A соответственно. ** р теста Стьюдента <0,001;

фиг. 15 - AAV нормального размера, двойные AAV транс-сплайсинг и гибридные АК векторы предоставляют наиболее устойчивую трансдукцию после субретинальной доставки мышам.

Получение изображений флуоресценции глазного дна в реальном времени глаз C57BL/6 через один месяц после субретинальной инъекции векторов AAV2/8, кодирующих EGFP. NZ: нормальный размер; OZ: AAV увеличенного размера; TS: двойной AAV транс-сплайсинг; AP: двойные AAV гибридные AP; АК: двойные AAV гибридные АК. Каждая панель демонстрирует различный глаз;

фиг. 16 - устойчивая экспрессия ABCA4 и MYO7A после доставки двойных AAV транс-сплайсинг и гибридных АК векторов в свиной сетчатке. (a) Вестерн-блот анализ сетчаточных лизатов крупной белой свиньи через 1 месяц после инъекции двойных AAV2/8 транс-сплайсинг (TS; n=2) и гибридных АК (АК; n=3) векторов, кодирующих ABCA4-3xflag, или AAV2/8 векторов, кодирующих NS EGFP (neg), в качестве негативного контроля, под контролем фоторецептор-специфичного промотора родопсина (RHO). (b) Вестерн-блот анализ сетчаточных лизатов крупной белой свиньи через один месяц после инъекции двойными AAV2/8 транс-сплайсинг (TS: n=5 RPE; n=3 сетчатка) и гибридными АК (АК: n=5 RPE, n=5 сетчатка) векторами, кодирующими MYO7A-НА под контролем убиквитарного промотора куриного бета актина (CBA), или одиночной 3'-половиной двойного AAV-MYO7A-НА (neg.), в качестве негативного контроля. (a-b) Стрелки указывают полноразмерные белки, маркер молекулярного веса отображен слева, 150-180 мкг белков загружали в каждую полосу. α -3xflag, антитело анти-3xflag; α -НА, антитело антигемагглютинин; α -дисферлин, антитело антидисферлин;

фиг. 17 - двойные AAV гибридные АК векторы с гетерологичными ITR трансдуцируют большие гены in vitro. (a) Конструирование двойных AAV гибридных АК векторов с гетерологичными ITR2 и ITR5. (b) Вестерн-блот анализ клеток HEK293, инфицированных с двойными AAV гибридными АК векторами с гетерологичными ITR, кодирующими ABCA4 (левая панель) и MYO7A (правая панель). Стрелки указывают полноразмерные белки, загружали 50 мкг белков, маркер молекулярного веса отображен слева. 5'+3': клетки, инфицированные совместно с 5'-и 3'-половинными векторами; 5': контрольные клетки, инфицированные только с 5'-половинным вектором; 3': контрольные клетки, инфицированные только с 3'-половинным вектором; neg.: клетки, инфицированные с AAV2/8 векторами, кодирующими EGFP. α -3xflag: антитело анти-3xflag; (X-MYO7A: антитело анти-MYO7A; α -филамин: антитело антифиламин. (a) Пром.: промотор; CDS: кодирующая последовательность; pA: сигнал полиаденилирования; SD: донорный сигнал сплайсинга; SA: акцепторный сигнал сплайсинга; точечные линии демонстрируют перекрывающиеся области, доступные для гомологичной рекомбинации, пунктирные линии демонстрируют сплайсинг, происходящий между SD и SA. Отображено положение гетерологичных ITR2 и ITR5.

Подробное описание изобретения

Материалы и способы.

Генерация AAV векторных плазмид.

Плазмиды, используемые для продуцирования вектора AAV, были получены из или pZac2.1 (52), или pAAV2.1 плазмид (53), которые содержат инвертированные терминальные повторы (ITR) серотипа

AAV 2 (таблица).

Плазмиды для продуцирования AAV вектора

	Плазмида	Размер ITR-ITR (п.о.)	AAV серотип	
			2/2	2/8
Нормального Размера (NZ)	pZac2.1-CMV-EGFP-SV40	3006	X	X
	pZac2.1-RHO-EGFP-SV40	2900		X
Увеличенного размера (OZ)	pAAV2.1-CMV-EGFP-9.9- BGH	9951	X	X
	pZac2.1-CMV-ABCA4_3xflag- SV40	8619	X	
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_HA-BGH	8220	X	
Перекрывающиеся (OV)	pZac2.1-CMV-ABCA4_5'	4900	X	X
	pZac2.1-RHO-ABCA4_5'	4805		X
	pZac2.1-RHOK-ABCA4_5'	4169		X
	pZac2.1-VMD2-ABCA4_5'	4658		X
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_5'	4708	X	X
	pAAV2.1-RHO- MYO7A_5'	4699		X
	pZac2.1-ABCA4_3'_3xflag_SV40	4740	X	X
	pAAV2.1-MYO7A_3'_HA_BGH	4655	X	X
Транс-сплайсинг (TS)	pZac2.1-CMV-ABCA4_5' TS	4431	X	
	pZac2.1-RHO-ABCA4_5' TS	4321		X
	pZac2.1-ABCA4_3' TS_3xflag_SV40	4587	X	X
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_5' TS	4468	X	X

	pAAV2.1-RHO- MYO7A _5' TS	4459		X
	pAAV2.1-MYO7A_3' TS_HA_BGH	4298	X	X
	pZac2.1-CMV-EGFP_5' TS	1906	X	X
	pZac2.1-RHO-EGFP_5' TS	1802		X
	pZac2.1-EGFP_3' TS_SV40	1510	X	X
Гибридная AP (AP)	pZac2.1-CMV-ABCA4_5' AP	4708	X	
	pZac2.1-ABCA4 _3' AP_3xflag_SV40	4871	X	
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_5' AP	4746	X	
	pAAV2.1-MYO7A_3' AP_HA_BGH	4576	X	
	pZac2.1-CMV-EGFP_5' AP	2183	X	X
	pZac2.1-EGFP_3' AP_SV40	1783	X	X
Гибридная AK (AK)	pZac2.1-CMV-ABCA4 _5' AK	4540	X	
	pZac2.1 (ITR5:2) -CMV-ABCA4_5' AK	4604	X	
	pZac2.1-RHO-ABCA4 _5' AK	4436		X
	pZac2.1-ABCA4 _3' AK_3xflag_SV40	4702	X	X
	pZac2.1 (ITR2:5) -ABCA4 _3' AK_3xflag_SV40	5192	X	
	pZac2.1-ABCA4 _3' AK_HA_SV40	4663		X
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_5' AK	4577	X	X
	pAAV2.1 (ITR5:2) -CBA-MYO7A_5' AK	4503	X	
	pAAV2.1-RHO- MYO7A _5' AK	4568		X
	pAAV2.1-MYO7A_3' AK_HA_BGH	4421	X	X
	pAAV2.1 (ITR2:5) - MYO7A_3' AK_HA_BGH	4386	X	
	pZac2.1-CMV-EGFP_5' AK	2015	X	X
	pZac2.1-RHO-EGFP_5' AK	1911		X
	pZac2.1-EGFP_3' AK_SV40	1614	X	X

Примечание: CMV: промотор цитомегаловируса; CBA: куриный бета-актин; RHO: человеческий промотор родопсина; RHOK: человеческий промотор родопсинкиназы; Vmd2: промотор вителлиформной макулярной дистрофии 2; EGFP: увеличенный зеленый флуоресцентный белок; ABCA4: член 4 человеческой АТФ-связывающей кассеты, подсемейства А; MYO7A: человеческий MYOSIN VIIA; SV40: сигнал полнаденилирования обезьяньего вируса 40; BGH: сигнал полнаденилирования бычьего гормона роста; 3xflag: 3xflag tag; HA: гемагглютининовая метка; AP: рекомбиногенная область щелочной фосфатазы;

АК: рекомбиногенная область фага F1; TS: транс-сплайсинг; ITR5:2: плазмида с левым ITR из серотипа AAV 5 и правым ITR из серотипа AAV 2; ITR2:5: плазмида с левым ITR из серотипа AAV 2 и правым ITR из серотипа AAV 5. Когда не специфицировано левый и правый ITR представляют собой ITR из серотипа AAV 2.

AAV векторные плазмиды нормального размера и увеличенного размера содержали полноразмерные экспрессионные кассеты, включая промотор, полноразмерный трансген CDS и сигнал полиадеинилирования (pA) (таблица). Две отдельных AAV векторные плазмиды (5' и 3'), требуемые для генерирования двойных AAV векторов, содержали или промотор с последующим N-терминальным участком трансгена CDS (5' плазмида), или C-терминальный участок трансгена CDS с последующим pA сигналом (3' плазмида, таблица). EGFP плазмиды нормального размера генерировали клонированием EGFP CDS плазмиды pAAV2.1-CMV-EGFP (720 п.о.) (53) в pZac2.1 (52); увеличенного размера EGFP генерировали из pAAV2.1-CMV-EGFP (53) вставкой ДНК спейсерной последовательности из 3632 п.о. из человеческого ABCA4 (NM_000350.2, п.о. 1960-5591) раньше CMV промотора и второй ДНК спейсерной последовательности из 3621 п.о., составленной из: мышинового ABCA4 (NM 007378.1, 1066-1 и 7124-6046 п.о.; в общем 2145 п.о.) и человеческого Harmonin (NM153676.3 131-1606 п.о.; в общем 1476 п.о.), после pA сигнала (этот конструктор использовали в экспериментах фиг. 1a, d, 4 и 15). Для генерирования двойных AAV векторных плазмид EGFP CDS (720 п.о.) разделяли на два конструктора: один, содержащий N-терминальный CDS (PMID: 9759496, п.о. 1-393), и другой, содержащий C-терминальный CDS (PMID: 9759496, п.о. 394-720).

Плазмиды ABCA4 увеличенного размера содержали полноразмерный человеческий ABCA4 CDS (GeneNM_000350.2, п.о. 105-6926), тогда как плазмиды MYO7A увеличенного размера содержали полноразмерный человеческий MYO7A CDS изоформы 1 (NM_000260.3, п.о. 273-6920). Для генерирования плазмид для двойных AAV OV векторов ABCA4 и MYO7A CDS разделяли на два конструктора, один, содержащий N-терминальный CDS (ABCA4: nm_000350.2, п.о. 105-3588; MYO7A: nm_000350.2, п.о. 273-3782), и другой, содержащий C-терминальный CDS (ABCA4: nm_000350.2, п.о. 2819-6926; MYO7A: nm_000350.2, п.о. 2913-6920).

Следовательно, область гомологии, разделяемой перекрывающимися векторными плазмидами, составляла 770 п.о. для ABCA4 и 870 п.о. для MYO7A. Для генерирования плазмид для двойных AAV OV векторов человеческий CEP290 CDS разделяли на два конструктора, один, содержащий N-терминальный CDS (CEP290: nm_025114, п.о. 345-4076) и другой, содержащий C-терминальный CDS (CEP290: nm_025114, п.о. 3575-7784). Следовательно, область гомологии, разделяемой перекрывающимися векторными плазмидами, составляла 502 п.о.

Для генерирования транс-сплайсинг и гибридных векторных плазмид ABCA4 и MYO7A CDS разделяли в естественном экзон-экзонном соединении. ABCA4 разделяли между экзонами 19-20 (5' половина: nm_000350.2, 105-3022 п.о.; 3' половина: nm_000350.2, п.о. 3023-6926) и MYO7A разделяли между экзонами 24-25 (5' половина: nm_000350.2, п.о. 273-3380; 3' половина: nm_000350.2, п.о. 3381-6926). Оба из ABCA4 и MYO7A белков метили на их C-конце: ABCA4 или с 3xflag (gactacaagaccatgacgggtgattataaagatcatgacatcgactacaaggatgacgatga saag), или гемагглютининовой (HA) меткой (tatccgatgatgtgccggattatgcg); MYO7A только с меткой HA. Для генерирования транс-сплайсинг и гибридных векторных плазмид CEP290 CDS разделяли в естественном экзон-экзонном соединении: между экзонами 29-30 (5' половина: nm_025114, 345-3805; 3' половина: nm_025114, 3806-7784). Белок CEP290 метили на его C-конце гемагглютининовой (HA) меткой. Донорный сигнал сплайсинга (SD) и акцепторный сигнал сплайсинга (SA), содержащиеся в транс-сплайсинг и гибридных двойных AAV векторных плазмидах, являлись следующими:

5'GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTTCGAGAC AGAGAAGACTCTTGCGTTTCT-3' (SD) SEQ ID No. 1;

5'GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG-3' (SA), SEQ ID No. 2. Рекомбиногенная последовательность, содержащаяся в гибридных AP векторных плазмидах (представлена как в первой, так и во второй плазмиде), была получена из генов (NM 001632, п.о. 823-1100) щелочной фосфотазы (AP), как описано ранее (39). Рекомбиногенная последовательность, содержащаяся в гибридных АК векторных плазмидах (представлена как в первой, так и во второй плазмиде), были получена из генома фага F1 (GeneBank номер доступа: J02448.1; п.о. 5850-5926). АК последовательность представляет собой

5'GGGATTTTGGCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATT TAACGCGAATTTTAACAAAAAT-3', SEQ ID No. 3.

Убиквитарный CMV промотор является промотором, содержащимся в pZac2.1 (52) или pAAV2.1-CMV-EGFP (53); убиквитарный CBA промотор получали из pAAV2.1-CBA-EGFP (11), PR-специфичные человеческие промоторы RHO и RHOK были получены из pAAV2.1-RHO-EGFP и pAAV2.1RHOK-EGFP, соответственно (10); RPE-специфичный промотор Vmd2 (NG_009033.1, 4870-5470 п.о.) соответствует ранее описанному промоторному фрагменту EcoRI-XcmI (41) и его амплифицировали посредством человеческой геномной ДНК.

Для генерирования двойных AAV гибридных АК векторов с гетерологичными ITR из серотипа

AAV 2 и 5 мы заменяли левый ITR2 из 5'-половины плазмиды и правый ITR2 3'-половины плазмиды на ITR5 (как отображено на фиг. 17а). Плазмиды для продуцирования AAV2 вектором с гетерологичными ITR являлись следующими: pZac5:2-CMV-5'ABCA4-SD-AK, pZac2:5-AK-SD-3'ABCA4-3xflag, pAAV5:2-CBA-5'MYO7A-SD-AK и pAAV2:5-AK-SD-3'MYO7A-RA (таблица).

Последовательности

Ген ABCA4

pZac2.1-CMV-ABCA4_5'AK

Левый ITR2

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA
GGGGTTCCT (SEQ ID No. 4)

Левый ITR5

CTCTCCCCCTGTGCGGTTGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGGCAGCTCAA
AGAGCTGCCAGACGACGGCCCTCTGGCCGTCGCCCCCACCAGAGCCAGCGAGCGAGCGAAC
GCGACAGGGGGAGAGTGCCACACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTAAGCAGTGA (SEQ ID
No. 5)

CMV энхансер

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGC
TATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA
ATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGAC (SEQ ID No. 6)

CMV промотор

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC
CGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG
GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA
CGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCAC
CCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
AATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
AGAGCTCGTTTAGTGAACCGT (SEQ ID No. 7)

Химерный интрон

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGA
GACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCT
TTCTCTCCACAG (SEQ ID No. 8)

Abca4 5'

ATGGGCTTCGTGAGACAGATACAGCTTTTGCTCTGGAAGAACTGGACCCTGCGGAAAA
GGCAAAAGATTTCGCTTTGTGGTGGAACTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCT
GGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCCAACAAAGGCGATGC
CCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCT
AAAGCCCCACCCCAGGAGAATCTCCTGGAATTGTGTCAAACATAACAACCTCCATCTTGCCAA
GGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGCCCGTA
TTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCCTCCGGACTCACCCGGAGAGAA
TTGCAGGAAGAGGAATTCGAATAAGGGATATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTATTTCT
TCATTAAAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTC
CAGAGCAGTTCGCTCATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCC
TCCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACGCGGGGCAAAGACGGTGCGCTATGCCCTGT
GCTCCCTCTCCCAGGGCACCCCTACAGTGGATAGAAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCT
TCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCCACACTCCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGAT
CTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAGTA
TGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCCCCCTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAGACCTTTACAA
AGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGGGTGC
TCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGGCCTTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGA
AGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAGAACAACATCCTTTTGTAATGCATTGATCCAGAGCC
TGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATGGGAAAAA
TCCTGTACACTCCTGATTCACCTGCAGCACGAAGGATACTGAAGAATGCCAACTCAACTTTTG
AAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGT
ACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCCTGGGGAACCCAACAGTAA
AAGACTTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCCTAAACTTCC
TCTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAACCTTCGACTGGAGGGACATAT
TTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCTTGTCAATCAATACCTGGAGTGCTTGGTCCTGGATA
AGTTTGAAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACGTGCCCTCTCTCTACTGGAGGAAA
ACATGTTCTGGGCCGAGTGGTATTCCCTGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCACCCC
ACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACCAATAAGATTAAAGACA
GGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGATCCCGTGGAAGATTTCCGGTACATCTGGGGCGGGT
TTGCCTATCTGCAGGACATGGTTGAACAGGGGATCACAAGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTC
CAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTGCTTCGTGGACGATTCTTTTCATGATCA
TCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGTCTGGCATGGATCTACTCTGTCTCCATGACTG
TGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGCGACTGAAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCT
CCAATGCAGTGATTTGGTGTACCTGGTTCCCTGGACAGCTTCTCCATCATGTGATGAGCATCT

TCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGGAAGAATCCTACATTACAGCGACCCATTCATCCTCT
 TCCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGCCACCATCATGCTGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCT
 TCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAGTGGTGTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCAC
 ACATCCTGTGCTTCGCCCTGGCAGGACCGCATGACCGCTGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTAC
 TGTCTCCGGTGGCATTGATTTGGACTGAGTACCTGGTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCCTGG
 GGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCCACGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCCTGCTGT
 CCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTGCTGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGG
 TGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACTTCCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCGTATTGGC
 TTGGCGGTGAAGGGTGTTCACCAGAGAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCCCTAACAG
 AGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGGAATACACGACTCCTTCTTTGAACGTGAGCATC
 CAGGGTGGGTTCCTGGGGTATGCGTGAAGAATCTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGGC
 CAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATCACCGCATTCCTGGGCCACA
 ATGGAGCTGGGAAAACCACCACCTT (SEQ ID No. 9)

Донорный сигнал сплайсинга

GTAAGTATCAAGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGA
 GACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT (SEQ ID No. 1)

АК

GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA
 ACGCGAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

Правый ITR2 (or 5' ITR2)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
 GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCAGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 AGCGCGCAG (SEQ ID No. 10)

Полноразмерная последовательность pZac2.1-CMV-ABCA4_5'AK

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCCATCACTA
 GGGGTTTCCTTGATGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
 AGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGG
 CTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
 AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC
 AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
 CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
 AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTT

TGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCA
AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAG
GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGAAG
CTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGT
CTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAG
ACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTG
ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCA
GTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCCTCGAGAA
TTCACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCGCCATGGGCTTCGTGAGACAGATACA
GCTTTTGCTCTGGAAGAACTGGACCCTGCGGAAAAGGCAAAAGATTGCTTTGTGGTGGAAC
CGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAG
CCATCATGAATGCCATTTCCCCAACAAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCA
GGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAGCCCCACCCCAGGAGAATCTCCTGG
AATTGTGTCAAACATAACAACCTCCATCTTGCAAGGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCT
CATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGCCGTATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCA
ATTCATGGACACCCTCCGGACTCACCCGGAGAGAATTGCAGGAAGAGGAATTCGAATAAGGGA
TATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTATTTCTCATTAATAAACATCGGCCTGTCTGACTC
AGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGTTCGCTCATGGAGTCCCGGA
CCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCCTCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCA
GAGACGCGGGGCAAAGACGGTGCGCTATGCCCTGTGCTCCCTCTCCCAGGGCACCCCTACAGTG
GATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCCACACT
CCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTC
ACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAGTATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCC
CCTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCT
GTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGGGTGCTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAA
CTATAAGGCCTTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAG
AACACATCCTTTTGTAATGCATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGC
TTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATGGGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGC
ACGAAGGATACTGAAGAATGCCAACTCAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGT
CAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAA
CATGATCAGAGATAACCTGGGGAACCCAACAGTAAAAGACTTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGA
AGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCCTAAACTTCCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGC
TGACGACATGGCCAACCTTCGACTGGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCT
TGTCAATCAATACCTGGAGTGCTTGGTCTGGATAAGTTTGAAAGCTACAATGATGAAACTCA
GCTCACCCAACGTGCCCTCTCTCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCC
TGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCACCCACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACAT

AGACGTGGTGGAGAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGA
 TCCCGTGGAAAGATTTCCGGTACATCTGGGGCGGGTTTGCCTATCTGCAGGACATGGTTGAACA
 GGGGATCACAAGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCC
 CTACCCCTGCTTCGTGGACGATTCTTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCAT
 GGTGCTGGCATGGATCTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTT
 GCGACTGAAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTTGGTGACCTGGTT
 CCTGGACAGCTTCTCCATCATGTTCGATGAGCATCTTCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGG
 AAGAATCCTACATTACAGCGACCCATTATCCTCTTCCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGC
 CACCATCATGCTGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTG
 TAGTGGTGTCTATTTTACCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCGCCTGGCAGGACCG
 CATGACCGCTGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTGGATTGGCAC
 TGAGTACCTGGTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAG
 TCCCACGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGTCTCCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTGC
 TGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACT
 TCCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCGTATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTCACCAGAGA
 AGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGA
 AGGAATACACGACTCCTTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTTCCTGGGGTATGCGTGAA
 GAATCTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTT
 CTACGAGAACCAGATCACCGCATTCCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCCACCTTGTA
 AGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGA
 AGACTCTTGCCTTTCTGGGATTTTGGCGATTTGGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
 ACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTCAGGTGGCATCTTTCC
 AATTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
 GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 AGCGCGCAG (SEQ ID No. 11)

pZac2.1-ABCA4_3'AK_SV40

Левый ITR2

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA
 GGGGTTTCCT (SEQ ID No. 4)

AK

GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA

ACGCGAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

Акцепторный сигнал сплайсинга

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ

ID No. 2)

Abca4_3'

GTCCATCCTGACGGGTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGG
GACATTGAAACCAGCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAACATC
CTGTTCCACCACCTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCCAGCTGAAAGGAAAGTCC
CAGGAGGAGGCCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCCTCCACCACAAGCGG
AATGAAGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTCGGTTGCCATTGCCTTT
GTGGGAGATGCCAAGGTGGTGATTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCTTACTCGAGA
CGCTCAATCTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTCAC
CACATGGACGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCCAGGGAAGGCTCTAC
TGCTCAGGCACCCCACTCTTCTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGACTTAACCTTGGTG
CGCAAGATGAAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCT
AAGGGTTTCTCCACCACGTGTCCAGCCCACGTGATGACCTAACTCCAGAACAAGTCCTGGAT
GGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAG
TGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCC
AGCCTTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTTGAATTTCT
GACACTCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTCAGGACCTCTGTTT
GCGGGTGGCGCTCAGCAGAAAAAGAGAAAACGTCAACCCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCAGA
GAGAAGGCTGGACAGACACCCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCAC
CCAGAGGGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCGCAGCTCAACACGGGGACACAG
CTGGTCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGCAGCCAC
AAGGACTTCCTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTTCT
ATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCCCTCACCCCTGGATATATGGGCAG
CAGTACACCTTCTTCAGCATGGATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTCACGGTACTTGCAGACGTC
CTCCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTACCCC
TGTGGCAACTCAACACCCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCCAGCTGTTCCAG
AAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCCTTACCATCCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAGAAGCTC
ACCATGCTGCCAGAGTGCCCCGAGGGTGCCGGGGGCCTCCCGCCCCCCCAGAGAACACAGCGC
AGCACGGAAATTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTAT
CCTGCTCTTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGA
ATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCCGAGTCGTCCCCATCACGGGGGAAGCACTTGTTGGGTTTTTA
AGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGGCCCTATCACTAGAGAGGCCTCTAAAGAA
ATACCTGATTTCTTAAACATCTAGAACTGAAGACAACATTAAGGTGTGGTTTAATAACAAA
GGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCACAACGCCATCTTACGGGCCAGCCTG
CCTAAGGACAGAAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCATTAGCCAACCCCTGAACCTGACC
AAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCACTTCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGC
GTGATTTTCTCCATGCTCCTTCGTCCCAGCCAGCTTTGTCCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTG

AACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAAACCAAC
 TTCTCTGGGACATCATGAATTATTCCGTGAGTGCTGGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGG
 TTTCAGAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCCTGCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTG
 TATGGATGGGCGGTCAATCCCATGATGTACCCAGCATCCTTCCTGTTTGATGTCCCCAGCACA
 GCCTATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTC
 ATCTTGGAATTATTTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTG
 CTCATTGTCTTCCCCCACTTCTGCCTGGGCCGGGGCCTCATTGACCTTGCACTGAGCCAGGCT
 GTGACAGATGTCTATGCCCCGTTTGGTGAGGAGCACTCTGCAAATCCGTTCCACTGGGACCTG
 ATTGGGAAGAACCTGTTTGCCATGGTGGTGAAGGGGTGGTGTACTTCCTCCTGACCTTGCTG
 GTCCAGCGCCACTTCTTCCTCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCACTAAGGAGCCCATTTGTTGAT
 GAAGATGATGATGTGGCTGAAGAAAGACAAAGAATTATTACTGGTGAAAATAAACTGACATC
 TTAAGGCTACATGAACCTAACCAAGATTTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGACAGGCTG
 TGTGTGCGAGTTGCCCTGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAAACA
 ACCACATTCAAGATGCTCACTGGGGACACCACAGTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGC
 AAGAGTATTTTAACCAATATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCTCAGTTTGAT
 GCAATCGATGAGCTGCTCACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTA
 CCAGCAGAAGAAATCGAAAAGTTGCAAACCTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCTGACTGTCTAC
 GCCGACTGCCTGGCTGGCACGTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCA
 CTCATTGGCTGCCCCACCGCTGGTGCTGCTGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCA
 CGCCGCATGCTGTGGAACGTCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCCCTCACA
 TCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCC
 TTTGATGTATGGGCACCATTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACA
 ATGAAGATCAAATCCCCGAAGGACGACCTGCTTCCTGACCTGAACCCTGTGGAGCAGTTCTTC
 CAGGGGAACCTCCAGGCAGTGTGCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTC
 TCCTCCTCCTCCCTGGCGAGGATCTTCAGCTCCTCCTCTCCACAAAGGACAGCCTGCTCATC
 GAGGAGTACTCAGTCACACAGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAAATTTTGCTAAACAGCAG
 ACTGAAAGTCATGACCTCCCTCTGCACCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGAC
 GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGAC
 AAGTGAGCGGCCGC (SEQ ID No. 12)

Sv40 polyA

TTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGCA
 GTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAG
 CTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGAT
 GTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCC
 TAGAGCATGGCTAC (SEQ ID No. 13)

Правый ITR2

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
 GGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 AGCGCGCAG (SEQ ID No. 10)

Правый ITR5

TCACTGCTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTGCGGTTT
 GCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGAGGGCCGTCGCTGGCAGCTCTTTGA
 GCTGCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAG (SEQ ID
 No. 14)

Полноразмерная последовательность pZac2.1-ABCA4_3'AK_SV40

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCT
TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA
GGGGTTCCCTGGATCCGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAA
CAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTTTCAGGTGGCATCTTTCGA
TAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCCATCCTGACGG
GTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGAAACCAGCCTGG
ATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAAACATCCTGTTCCACCACCTCACGG
TGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCCAGCTGAAAGGAAAGTCCCAGGAGGAGGCCCAGCTGG
AGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGAATGAAGAGGCTCAGGACC
TATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTGGTTGCCATTGCCTTTGTGGGAGATGCCAAGGTGG
TGATTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCCCTTACTCGAGACGCTCAATCTGGGATCTGC
TCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTCACCACATGGACGAGGCCGACC
TCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCCAGGGAAGGCTCTACTGCTCAGGCACCCCACTCT
TCCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTTGGTGCGCAAGATGAAAAACATCC
AGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTCTCCACCACGT
GTCCAGCCCACGTGATGACCTAACTCCAGAACAAGTCTGGATGGGGATGTAAATGAGCTGA
TGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAGTGCATTGGTCAAGAACTTA
TCTTCCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTTTTCAGAGAGCTGG
AGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTTGAATTTCTGACACTCCCCTGGAAGAGA
TTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTTCAGGACCTCTGTTTGCGGGTGGCGCTCAGCAGA
AAAGAGAAAACGTCAACCCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACAC
CCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCACCCAGAGGGCCAGCCTCCCC
CAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCCGAGCTCAACACGGGGACACAGCTGGTCCTCCAGCATGTGC
AGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGCAGCCACAAGGACTTCCTGGCGCAGA
TCGTGCTCCCGGTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTTCTATTGTTATCCCTCCTTTTG
GCGAATACCCCGCTTTGACCCTTCACCCCTGGATATATGGGCAGCAGTACACCTTCTTCAGCA
TGGATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTCACGGTACTTGCAGACGTCCTCCTGAATAAGCCAGGCT

TTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTACCCCTGTGGCAACTCAACACCCT
GGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCCAGCTGTTCCAGAAGCAGAAATGGACACAGG
TCAACCCTTCACCATCCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGCCAGAGTGCC
CCGAGGGTGCCGGGGGCCCTCCCGCCCCCCCAGAGAACACAGCGCAGCACGGAAATTCTACAAG
ACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCTTATAAGAAGCA
GCTTAAAGAGCAAATTCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGC
TCCCAGTCGTCCCCATCACGGGGGAAGCACTTGTGGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCA
TGAATGTGAGCGGGGGGCCCTATCACTAGAGAGGCCTCTAAAGAAATACCTGATTTCTTAAAC
ATCTAGAAACTGAAGACAACATTAAGGTGTGGTTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCA
GCTTTCTCAATGTGGCCACAACGCCATCTTACGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCCG
AGGAGTATGGAATCACCGTCATTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGA
TTACAGTGCTGACCACTTCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGTCCT
TCGTCCCAGCCAGCTTTGTCCCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCC
AGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAAACCAACTTCCTCTGGGACATCATGA
ATTATTCCTGAGTGCTGGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAGAAGAAAGCCTACA
CTTCTCCAGAAAACCTTCCTGCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTCATTC
CCATGATGTACCCAGCATCCTTCCTGTTTGATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCTTTATCTT
GTGCTAATCTGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGGAATTATTTGAGA
ATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCCACT
TCTGCCTGGGCCGGGGCCTCATTGACCTTGCACTGAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCC
GGTTTGGTGAGGAGCACTCTGCAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACCTGTTTG
CCATGGTGGTGGAAGGGGTGGTGTACTTCCTCCTGACCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCC
TCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCCTAAGGAGCCCATTGTTGATGAAGATGATGATGTGGCTG
AAGAAAGACAAAGAATTATTACTGGTGAAATAAAACTGACATCTTAAGGCTACATGAACATA
CCAAGATTTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTGCGAGTTCGCCCTG
GAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAACAACCACATTCAAGATGCTCA
CTGGGGACACCACAGTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTTAACCAATA
TTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCTCAGTTTGATGCAATCGATGAGCTGCTCA
CAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCCGCTTCGAGGTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAA
AGGTTGCAAACCTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCTGACTGTCTACGCCGACTGCCTGGCTGGCA
CGTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCTGCCCACCGC
TGGTGTGCTGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGCATGCTGTGGAACG
TCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCCTCACATCCCACAGCATGGAAGAAT
GTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTTCGATGTATGGGCACCA
TTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCAAATCCCCGA
AGGACGACCTGCTTCCTGACCTGAACCCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAACCTCCCAGGCA

GTGTGCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTCTCCTCCTCCTCCCTGGCGA
 GGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCCACAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCAGTCACAC
 AGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAAATTTTGCTAAACAGCAGACTGAAAGTCATGACCTCC
 CTCTGCACCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGACTGAGCGGCCGCTTCGAGCA
 GACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC
 TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAA
 GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTT
 TAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAGGATCTTCCTAGAGCATGGCTA
 CGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC
 CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 15)

pZac2.1-CMV-ABCA4_5'TS

Полноразмерная последовательность pZac2.1-CMV-ABCA4_5'TS

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
 AGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGG
 CTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
 AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGG
 CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC
 AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT
 ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG
 CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
 AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTT
 TGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCA
 AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAG
 GCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGAAG
 CTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGT
 CTCGAACCTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAG
 ACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTG
 ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCA
 GTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCCTCGAGAA
 TTCACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCCATGGGCTTCGTGAGACAGATACA
 GCTTTTGTCTCTGGAAGAACTGGACCCTGCGGAAAAGGCAAAAGATTTCGCTTTGTGGTGGAAC
 CGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAG

CCATCATGAATGCCATTTCCCCAACAAAGGCGATGCCCTCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCA
 GGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAAGCCCCACCCAGGAGAATCTCCTGG
 AATTGTGTCAAACCTATAACAACCTCCATCTTGGCAAGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCT
 CATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCA
 ATTCATGGACACCCCTCCGGA CTCACCCGGAGAGAATTGCAGGAAGAGGAATTCGAATAAGGGA
 TATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTATTTCTCATTA AAAACATCGGCCTGTCTGACTC
 AGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAGAGCAGTTCGCTCATGGAGTCCCGGA
 CCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCCTCCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCA
 GAGACGCGGGGCAAAGACGGTGCCTATGCCCTGTGCTCCCTCTCCAGGGCACCCCTACAGTG
 GATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCACACT
 CCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTC
 ACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAGTATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCC
 CCTCATGCAGAAATGGTGGTCCAGAGACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCT
 GTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGGTGCTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAA
 CTATAAGGCCTTTCTGGGGATTGACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAG
 AACACATCCTTTTGTAAATGCATTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGC
 TTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATGGGAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGC
 ACGAAGGATACTGAAGAATGCCAACTCAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGT
 CAAAGCCTGGGAAGAAAGTAGGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAA
 CATGATCAGAGATACCCTGGGGAACCCAACAGTAAAAGACTTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGA
 AGAAGGTATTACTGCTGAAGCCATCCTAACTTCCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGC
 TGACGACATGGCCAACTTCGACTGGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCT
 TGTCAATCAATACCTGGAGTGCTTGGTCTTGATAAGTTTGAAAGCTACAATGATGAACTCA
 GCTCACCCAACGTGCCCTCTCTCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCC
 TGACATGTATCCCTGGACCAGCTCTCTACCACCCACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACAT
 AGACGTGGTGGAGAAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGA
 TCCCGTGGAAGATTTCCGGTACATCTGGGGCGGGTTGCCTATCTGCAGGACATGGTTGAACA
 GGGGATCACAAAGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCC
 CTACCCCTGCTTCGTGGACGATTCTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCAT
 GGTGCTGGCATGGATCTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTT
 GCGACTGAAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTTGGTGTACCTGGTT
 CCTGGACAGCTTCTCCATCATGTGATGAGCATCTTCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGG
 AAGAATCCTACATTACAGCGACCCATTATCCTCTTCCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGC
 CACCATCATGCTGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTG
 TAGTGGTGTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCGCCTGGCAGGACCG
 CATGACCGCTGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTTGGATTTGGCAC

TGAGTACCTGGTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAG
 TCCCACGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCCTGCTGTCCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTGC
 TGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACT
 TCCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCGTATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTCAACCAGAGA
 AGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGA
 AGGAATACACGACTCCTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGTGGGTTCCTGGGGTATGCGTGAA
 GAATCTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTT
 CTACGAGAACCAGATCACCGCATTCCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCACCACCTTGTA
 AGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGA
 AGACTCTTGCGTTTCTCAATTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC
 GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
 GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 16)

pZac2.1-ABCA4_3'TS_SV40

Полноразмерная последовательность pZac2.1-ABCA4_3'TS_SV40

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTCCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTC
 CATCCTGACGGGTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGA
 AACCAGCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAAACATCCTGTTCCA
 CCACCTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCCAGCTGAAAGGAAAGTCCCAGGAGGA
 GGCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGAATGAAGA
 GGCTCAGGACCTATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTCGGTTGCCATTGCCTTTGTGGGAGA
 TGCCAAGTGTTGATTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCCCTACTCGAGACGCTCAAT
 CTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTCACCACATGGA
 CGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCCAGGGAAGGCTCTACTGCTCAGG
 CACCCCACTCTTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTAACCTTGGTGCGCAAGAT
 GAAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTT
 CTCCACCACGTGTCCAGCCCACGTCGATGACCTAACTCCAGAACAAGTCTGGATGGGGATGT
 AAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAGTGCATTGG
 TCAAGAACTTATCTTCCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTTTT
 CAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTTGAATTTCTGACACTCC
 CCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTAGGACCTCTGTTTGGGGTGG
 CGCTCAGCAGAAAAAGAGAAAACGTCAACCCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCAGAGAGAAGGC
 TGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCAGCCAGAGGG
 CCAGCCTCCCCCAGAGCCAGAGTGCCCAGGCCCGCAGCTCAACACGGGGACACAGCTGGTCCT
 CCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGAGCCACAAGGACTT

CCTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTTCTATTGTTAT
CCCTCCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCCTTCACCCCTGGATATATGGGCAGCAGTACAC
CTTCTTCAGCATGGATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTCACGGTACTTGCAGACGTCTCTCTGAA
TAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTACCCCTGTGGCAA
CTCAACACCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCCAGCTGTTCCAGAAGCAGAA
ATGGACACAGGTCAACCCCTTACCATCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCT
GCCAGAGTGCCCCGAGGGTGCCGGGGGCCTCCCGCCCCCAGAGAACACAGCGCAGCACGGA
AATTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCT
TATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTCTGGGTCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCAT
TGGAGGAAAGCTCCCAGTCGTCCCCATCACGGGGGAAGCACTTGTTGGGTTTTTAAGCGACCT
TGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGCCCTATCACTAGAGAGGCCTCTAAAGAAATACCTGA
TTTCCTTAAACATCTAGAACTGAAGACAACATTAAGGTGTGGTTTAATAACAAAGGCTGGCA
TGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCACAACGCCATCTTACGGGCCAGCCTGCCTAAGGA
CAGAAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCATTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGGAGCA
GCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCACTTCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTT
CTCCATGTCCTTCGTCCCAGCCAGCTTTGTCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATC
CAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAACCAACTTCCTCTG
GGACATCATGAATTATTCGTGAGTGCTGGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAGAA
GAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCCTGCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATG
GGCGGTCAATTCCCATGATGTACCCAGCATCCTTCCTGTTTGATGTCCCCAGCACAGCCTATGT
GGCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGA
ATTATTTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGT
CTTCCCCCACTTCTGCCTGGGCCGGGGCCTCATTGACCTTGCACTGAGCCAGGCTGTGACAGA
TGTCTATGCCCGGTTTGGTGAGGAGCACTCTGCAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAA
GAACCTGTTTGCCATGGTGGTGGAAGGGGTGGTGTACTTCCTCCTGACCCTGCTGGTCCAGCG
CCACTTCTTCTCTCCCAATGGATTGCCGAGCCCACTAAGGAGCCCATTGTTGATGAAGATGA
TGATGTGGCTGAAGAAAGACAAAGAAATTATTACTGGTGGAATAAACTGACATCTTAAGGCT
ACATGAACTAACCAAGATTTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGACAGGCTGTGTGTCGG
AGTTGCCCCGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAACAACCACATT
CAAGATGCTCACTGGGGACACCACAGTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTAT
TTTAACCAATATTTCTGAAGTCCATCAAAAATATGGGCTACTGTCCTCAGTTTGATGCAATCGA
TGAGCTGCTCACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTACCAGCAGA
AGAAATCGAAAAGGTTGCAAACCTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCTGACTGTCTACGCCGACTG
CCTGGCTGGCACGTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGG
CTGCCCACCGCTGGTGTGCTGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGCAT
GCTGTGGAACGTCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCCTCACATCCCACAG

CATGGAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTTCGATG
TATGGGCACCATTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGAT
CAAATCCCCGAAGGACGACCTGCTTCCTGACCTGAACCCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAA
CTTCCCAGGCAGTGTGCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTCTCCTCCTC
CTCCCTGGCGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCCAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTA
CTCAGTCACACAGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAATTTTGTAAACAGCAGACTGAAAG
TCATGACCTCCCTCTGCACCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGACTGAGCGGC
CGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGT
GAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCT
GCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGT
GGGAGGTTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCCTA
GAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTG
ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC
GCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID
No. 17)

MYO7A**pAAV2.1-CBA-MYO7A_5'AK****5' ITR2**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCG
AGCGCGCAG (SEQ ID No. 10)

Левый ITR5

CTCTCCCCCTGTGCGGTTGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGGCAGCTCAA
AGAGCTGCCAGACGACGGCCCTCTGGCCGTGCCCCCAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAAC
GCGACAGGGGGGAGAGTGCCACACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTAAGCAGTGA (SEQ ID
No. 18)

Энхансер CMV

GCTAGCGTGCCACCTGGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA
CGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT
GGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG (SEQ ID No. 19)

Промотор CBA

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCC
AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGACGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGG
GCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG
CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGG
CCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGG (SEQ ID No. 20)

Интрон SV40

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGA
GACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCTT
TTCTCTCCACAG (SEQ ID No. 21)

5'hMYO7A CDS

ATGGTGATTCTTCAGCAGGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGATTGGGGCAGGAGT
TCGACGTGCCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGTCCAGGTGGTGGATG
ATGAAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGCAGAACGCAACGCACATCAAGCCTATGCACCCCA
CGTCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCCTGGGGGACCTCAACGAGGCGGGCATCTTGC
GCAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCACCTCATCTACACGTATACGGGCTCCATCCTGGTGG
CTGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACATCCGCCAGTATACCAACA
AGAAGATTGGGGAGATGCCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACAACTGCTACTTCAACATGA
AACGCAACAGCCGAGACCAGTGCTGCATCATCAGTGGGGAATCTGGGGCCGGGAAGACGGAGA
GCACAAAGCTGATCCTGCAGTTCCTGGCAGCCATCAGTGGGCAGCACTCGTGGATTGAGCAGC
AGGTCTTGGAGGCCACCCCCATTCTGGAAGCATTTGGGAATGCCAAGACCATCCGCAATGACA
ACTCAAGCCGTTTCGGAAAGTACATCGACATCCACTTCAACAAGCGGGGCGCCATCGAGGGCG
CGAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTCACGTGTCTGTGCCAGGCCCTGGATGAAAGGA
ACTACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTGAGGATCAGAAGAAGAAGCTGGGCT
TGGGCCAGGCCTCTGACTACAACCTACTTGGCCATGGGTAACCTGCATAACCTGTGAGGGCCGGG
TGGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCATGAAGGTGCTCATGTTCACTGACACCG
AGAACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCCTGCACCTGGGCAACCTGCAGTATGAGG
CACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTTCTCTTCTCCCCATCGCTGGCCACAGCTG
CATCCCTGCTTGAGGTGAACCCCCCAGACCTGATGAGCTGCCTGACTAGCCGCACCCTCATCA
CCCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCCTGAGCAGGGAACAGGCACTGGACGTGCGCGACGCCT
TCGTAAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTCTGTGTGGATTGTGGACAAGATCAACGCAGCAATTT
ACAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGAACTCTCGCAGGTCCATCGGCCTCCTGGACATCTTTG
GGTTTGAGAACTTTGCTGTGAACAGCTTTGAGCAGCTCTGCATCAACTTCGCCAATGAGCACC
TGCAGCAGTTCTTTGTGCGGCACGTGTTCAAGCTGGAGCAGGAGGAATATGACCTGGAGAGCA
TTGACTGGCTGCACATCGAGTTCCTGACAACCAGGATGCCCTGGACATGATTGCCAACAAGC
CCATGAACATCATCTCCCTCATCGATGAGGAGAGCAAGTTCCCCAAGGGCACAGACACCACCA
TGTTACACAAGCTGAACTCCCAGCACAAAGCTCAACGCCAACTACATCCCCCCCCAAGAACAACC
ATGAGACCCAGTTTGGCATCAACCATTTTGCAGGCATCGTCTACTATGAGACCCAAGGCTTCC

TGGAGAAGAACCGAGACACCCTGCATGGGGACATTATCCAGCTGGTCCACTCCTCCAGGAACA
 AGTTCATCAAGCAGATCTTCCAGGCCGATGTCGCCATGGGCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGC
 CCACACTTAGCAGCCAGTTCAAGCGGTCACTGGAGCTGCTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCC
 AGCCCTTCTTTGTGCGATGCATCAAGCCCAATGAGTTCAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCGGC
 ACCTGTGCGTGCGCCAGCTGCGGTACTCAGGAATGATGGAGACCATCCGAATCCGCCGAGCTG
 GCTACCCCATCCGCTACAGCTTCGTAGAGTTTGTGGAGCGGTACCGTGTGCTGCTGCCAGGTG
 TGAAGCCGGCCTACAAGCAGGGCGACCTCCGCGGGACTTGCCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGC
 TGGGCACCCACGATGACTGGCAGATAGGCAAAACCAAGATCTTCTGAAGGACCACCATGACA
 TGCTGCTGGAAGTGGAGCGGGACAAAGCCATCACCGACAGAGTCATCCTCCTTCAGAAAGTCA
 TCCGGGGATTCAAAGACAGGTCTAACTTTCTGAAGCTGAAGAACGCTGCCCACTGATCCAGA
 GGCCTGGCGGGGTCACTGTAGGAAGAACTACGGGCTGATGCGTCTGGGCTTCTGCGGC
 TGCAGGCCCTGCACCGCTCCCGGAAGCTGCACCAGCAGTACCGCCTGGCCCGCCAGCGCATCA
 TCCAGTTCCAGGCCCGCTGCCGCGCCTATCTGGTGCGCAAGGCCTTCCGCCACCGCCTCTGGG
 CTGTGCTCACCGTGCAGGCCTATGCCCGGGGCATGATCGCCCGCAGGCTGCACCAACGCCTCA
 GGGCTGAGTATCTGTGGCGCCTCGAGGCTGAGAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTC
 GGAAGGAGATGAGCGCCAAGAAGGCCAAGGAGGAGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGG
 CCCAGCTGGCTCGTGAGGACGCTGAGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGA
 AGGAGCTCCTGGAGCAGATGGAAAGGGCCCGCCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGG
 ACAAGATGTTTGGCTTCTGGGGACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTA
 GTGGCTTTGAGGACCTGGAGCGAGGGCGGAGGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCC
 TGCCCCCTGCCTGACGAGGATGAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAATTTGCCAAGTTTCGCGGCCA
 CCTACTTCCAGGGGACAACTACGCACTCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCT
 ACCATGACGACGAGGGTGACCAGCTG (SEQ ID No. 22)

Донорный сигнал сплайсинга

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCTGA
 GACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT (SEQ ID No. 1)

АК

GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA
 ACGCGAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

3'ITR2

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTCT (SEQ ID No. 4)

Полная последовательность рAAV2.1-СВА-MYO7A_5'АК

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA

GGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
AGATCCTAATCGGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGTGCCACCTGGTCGACATTGATTATTGACT
AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTT
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAC
TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGG
GGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG
CGCGGCGGGCGGCTGCAGAAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAG
ACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTG
ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGC
CGCCATGGTGATTCTTCAGCAGGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGATTGGGGCAGGAGTT
CGACGTGCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGTCCAGGTGGTGATGA
TGAAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGAGAACGCAACGCACATCAAGCCTATGCACCCAC
GTCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCTGGGGGACCTCAACGAGGCGGGCATCTTGCG
CAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCACCTCATCTACACGTATACGGGCTCCATCCTGGTGGC
TGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACATCCGCCAGTATACCAACAA
GAAGATTGGGGAGATGCCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACAACTGCTACTTCAACATGAA
ACGCAACAGCCGAGACCAGTGCTGCATCATCAGTGGGGAATCTGGGGCCGGGAAGACGGAGAG
CACAAAGCTGATCCTGCAGTTCCTGGCAGCCATCAGTGGGCAGCACTCGTGGATTGAGCAGCA
GGTCTTGAGAGCCACCCCCATTCTGGAAGCATTGTTGGAATGCCAAGACCATCCGCAATGACAA
CTCAAGCCGTTTCGGAAAGTACATCGACATCCACTTCAACAAGCGGGGCGCCATCGAGGGCGC
GAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTCACGTGTCTGTGCGCCAGGCCCTGGATGAAAGGAA
CTACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTGAGGATCAGAAGAAGAAGCTGGGCTT
GGGCCAGGCCTCTGACTACAACTACTTGGCCATGGGTAACTGCATAACCTGTGAGGGCCGGGT
GGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCATGAAGGTGCTCATGTTCACTGACACCGA
GAACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCCTGCACCTGGGCAACCTGCAGTATGAGGC
ACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTTCTCTTCTCCCCATCGCTGGCCACAGCTGC
ATCCCTGCTTGAGGTGAACCCCCCAGACCTGATGAGCTGCCTGACTAGCCGCACCCCTCATCAC
CCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCCTGAGCAGGGAACAGGCACTGGACGTGCGCGACGCCTT
CGTAAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTCGTGTGGATTGTGGACAAGATCAACGCAGCAATTTA
CAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGAACTCTCGCAGGTCCATCGGCCTCCTGGACATCTTTGG

GTTTGAGAACTTTGCTGTGAACAGCTTTGAGCAGCTCTGCATCAACTTCGCCAATGAGCACCT
GCAGCAGTTCTTTGTGCGGCACGTGTTCAAGCTGGAGCAGGAGGAATATGACCTGGAGAGCAT
TGACTGGCTGCACATCGAGTTCACTGACAACCAGGATGCCCTGGACATGATTGCCAACAAGCC
CATGAACATCATCTCCCTCATCGATGAGGAGAGCAAGTTCCCCAAGGGCACAGACACCACCAT
GTTACACAAGCTGAACTCCCAGCACAAAGCTCAACGCCAACTACATCCCCCCCCAAGAACAACCA
TGAGACCCAGTTTGGCATCAACCATTTTGCAGGCATCGTCTACTATGAGACCCAAGGCTTCCT
GGAGAAGAACCAGACACCCTGCATGGGGACATTATCCAGCTGGTCCACTCCTCCAGGAACAA
GTTTCATCAAGCAGATCTTCCAGGCCGATGTCGCCATGGGCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGCC
CACACTTAGCAGCCAGTTCAAGCGGTCACTGGAGCTGCTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCCA
GCCCTTCTTTGTGCGATGCATCAAGCCCAATGAGTTCAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCGGCA
CCTGTGCGTGCGCCAGCTGCGGTACTCAGGAATGATGGAGACCATCCGAATCCGCCGAGCTGG
CTACCCCATCCGCTACAGCTTCGTAGAGTTTGTGGAGCGGTACCGTGTGCTGCTGCCAGGTGT
GAAGCCGGCTACAAGCAGGGCGACCTCCGCGGGACTTGCCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGCT
GGGCACCCACGATGACTGGCAGATAGGCAAAAACCAAGATCTTTCTGAAGGACCACCATGACAT
GCTGCTGGAAGTGGAGCGGGACAAAGCCATCACCGACAGAGTCATCCTCCTTCAGAAAGTCAT
CCGGGGATTCAAAGACAGGTCTAACTTTCTGAAGCTGAAGAACGCTGCCACACTGATCCAGAG
GCACTGGCGGGGTCACAACTGTAGGAAGAACTACGGGCTGATGCGTCTGGGCTTCCTGCGGCT
GCAGGCCCTGCACCGCTCCCGGAAGCTGCACCAGCAGTACCGCCTGGCCCCGCCAGCGCATCAT
CCAGTTCCAGGCCCGCTGCCGCGCTATCTGGTGCGCAAGGCCTTCCGCCACCGCCTCTGGGC
TGTGCTCACCGTGCAGGCCTATGCCCGGGGCATGATCGCCCGCAGGCTGCACCAACGCCTCAG
GGCTGAGTATCTGTGGCGCCTCGAGGCTGAGAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTCG
GAAGGAGATGAGCGCCAAGAAGGCCAAGGAGGAGGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGGC
CCAGCTGGCTCGTGAGGACGCTGAGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGAA
GGAGCTCCTGGAGCAGATGGAAAGGGCCCGCCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGGA
CAAGATGTTTGGCTTCCTGGGGACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTAG
TGGCTTTGAGGACCTGGAGCGAGGGCGGAGGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCCT
GCCCCTGCTGACGAGGATGAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAATTTGCCAAGTTCGCGGCCAC
CTACTTCCAGGGGACAACTACGCACTCCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCTA
CCATGACGACGAGGGTGACCAGCTGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCA
ATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGGGATTTTGCCGATTTTCGG
CCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAACAAAAATATTA
CGTTTATAATTTAGGTGGCATCTTTCCAATTGAAGGGCGAATTCGATCTTCCTAGAGCATG
GCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGT
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGAC
GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 23)

pAAV2.1-MYO7A_3'AK_BGH
5' ITR2

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
AGCGCGCAG (SEQ ID No. 10)

AK

GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTA
ACGCGAATTTTAACAAAAAT (SEQ ID No. 3)

Акцепторный сигнал сплайсинга

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ

ID No. 1)

3'hMYO7A CDS

GCAGCCCTGGCGGTCTGGATCACCATCCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCA
 AGTACCACACAGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGA
 CCCTGGGCAAGAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGCCCAGC
 TCCCCGAGGGCCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGA
 AGTCCAAGCTCACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGGAGTCCACAGTGCAGGGCA
 ACAGCATGCTGGAGGACCGGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACTTCATCATCGGCAATG
 GCATCCTGCGGCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCACA
 ACCCTCCAAGAGCAGCTATGCCCCGGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGGCTGTTTCG
 CCCCCTCCGAGAAGTTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCCGGCTACG
 CCCCCTACTGTGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCCGCCCA
 GCTGGCTGGAGCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACATTCATGG
 ATGGGACCACCAAGACCTGCTGACGGAACCTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGCAACGCGC
 TGGCCGACAAGATCTCTCTCAAGGACCGGTTCTGGGTTCTCCCTCTACATTGCCCTGTTTGACA
 AGGTGTCTCCCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTATGGACGCCATCTCCAGTGCGAGCAGT
 ACGCCAAGGAGCAGGGCGCCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTCCGCAAAGAGG
 TCTTCACGCCCTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCATCTACCAGCAGG
 TGGTGCAGGAGTCAAGTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACCTGGCTGAGCTGG
 CCTCCCAGCAGTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGCCTCCTGAACCTCG
 TGCCACCTACATCCCCGACCGCGAGATCACGCCCCCTGAAGACGCTGGAGAAGTGGGCCCAGC
 TGGCCATCGCCGCCACAAGAAGGGGATTTATGCCCAGAGGAGAACTGATGCCCAGAAGGTCA
 AAGAGGATGTGGTCAGTTATGCCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTCTCCAGGTTTTATGAAG
 CCTACAAATTCTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGTGGCCGTCAACTGGACGG
 GTGTGTACTTTGTGGATGAGCAGGAGCAGGTACTTCTGGAGCTGTCCCTCCAGAGATCATGG
 CCGTGTCCAGCAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGCTGCTCTGATCTTGGCTGTG
 CTGCGCCTCACTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGCGGGGCCCTGTTCTCCGTGTTGGTCCT

GCAGGGGAGCGAAAACGACGGCCCCCAGCTTCACGCTGGCCACCATCAAGGGGGACGAATACA
 CCTTCACCTCCAGTAATGCTGAGGACATTCTGTGACCTGGTGGTCACCTTCCTAGAGGGGCTCC
 GGAAGAGATCTAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCCCAACCCGCAGGCGAGGAGTCAG
 GCTTCCTCAGCTTTGCCAAGGGAGACCTCATCATCCTGGACCATGACACGGGCGAGCAGGTCA
 TGAACCTCGGGCTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACCAAGCAGCGTGGGGACTTCCCCACCG
 ACTGTGTGTACGTTCATGCCCCTGTCAACCATGCCACCTCGTGAGATTGTGGCCCTGGTCACCA
 TGACTCCCGATCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCTTGCAGCTGCGAACGGCGGAGCCCGAGG
 TCGGTGCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCTATGACTACTTCAGGCCCCCACCACAGC
 ACACGCTGAGCCGTGTCTGTTGTCCAAGGCCCGAGGCAAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGC
 GGGAACCGCTCAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGCTCCTGGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGG
 CCTGCCTGGCCTTCATTGCTGTGCTCAAGTACATGGGCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCT
 CCGTCAATGAGCTCACCGACCAGATCTTTGAGGGTCCCCTGAAAGCCGAGCCCCCTGAAGGACG
 AGGCATATGTGCAGATCCTGAAGCAGCTGACCGACAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGG
 GTTGGGAGCTGCTCTGGCTGTGCACGGGCCCTTTTCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCCCACG
 TGCAGCGCTTCTCTGCAGTCCCGAAAGCACTGCCCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCC
 AGAAAGCCCTGAGAAACGGGTCCCAGGAGTACCCCTCCGCACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCC
 AGCACAAGACCACCCAGATTTTCCACAAGGTCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCCTTCG
 AAGTGGAGTCCAGCACCAAGGCCAAGGACTTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCA
 AGTCCTCAGAGGGATTTCAGCCTCTTTGTCAAATTCAGACAAGGTCATCAGCGTTCTTGAGA
 ATGACTTCTTCTTTGACTTTGTTTCGACACTTGACAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGCCCCATCA
 AGGACCGGAATTGTGCCCTCACTCACCTACCAGGTGTTCTTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCA
 CGGTGCCAGGGAAGGATCCCATGGCCGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCCAAGT
 ATCTCCGAGGCTACCACAAGTGCACGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGCTGATCTACA
 GGGTCAAGTTCGAGGAGGACAAGTCTTCTTCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGG
 TGCCCCAGGACCTTATCCGGCAGGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTCGCCCTACT
 TCAACAAGCACGCAGGGAAGTCCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCCTGAAGCTCATCTTCA
 AGTGGCCCCACCTTTGGCTCAGCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACCTACGGAGCCAAACTTCCCTG
 AGATCCTCCTAATTGCCATCAACAAGTATGGGGTCAGCCTCATCGATCCCAAACGAAGGATA
 TCCTCACCCTCATCCCTTACCAAGATCTCCAAGTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACA
 TCACCATTTGGGAAGTGGTGCAGCGGAGCAAAGTCTGCTGCGAGACGTCACTGGGCTACAAGA
 TGGATGACCTCCTGACTTCTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCT
 CCAGGAGCGGCAAGTGA (SEQ ID No. 24)

BGH poly A

GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTT
 CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC
 ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG
 ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA (SEQ ID No. 25)

3'ITR2

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTCCCT (SEQ ID No. 4)

Правый ITR5

TCACTGCTTACAAAACCCCCTTGCTTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTCGCGTTC
 GCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGAGGGCCGTCGTCTGGCAGCTCTTTGA
 GCTGCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAG (SEQ ID
 No. 14)

Полная последовательность pAAV2.1-MYO7A_3'AK_BGH

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA
 GGGGTTCCTTGTAAGTAAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
 AGATCGGAATTCGCCCTTTGATCAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAG
 CTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTTAGGTGGC
 ATCTTTTCGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGCAGC
 CCTGGCGGTCTGGATCACCATCCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCAAGTACCACAC
 AGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGACCCTGGGCAA
 GAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGGCCAGCTCCCCGAGGG
 CCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGAAGTCCAAGCT
 CACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGGAGTCCACAGTGCAGGGCAACAGCATGCT
 GGAGGACCGGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACTTCATCATCGGCAATGGCATCCTGCG
 GCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCACAACCCCTCCAA
 GAGCAGCTATGCCCCGGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGCTGTTTCGCCCCCTCCGA
 GAAGTTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCGCCCGGCTACGCCCCGTACTG
 TGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCCGCCAGCTGGCTGGA
 GCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACATTCATGGATGGGACCAC
 CAAGACCCTGCTGACGGACTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGCAACGCGCTGGCCGACAA
 GATCTCTCTCAAGGACCGGTTTCGGGTTCTCCCTCTACATTGCCCTGTTTGACAAGGTGTCTC
 CCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTATGGACGCCATCTCCAGTGCGAGCAGTACGCCAAGGA
 GCAGGGCGCCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTCCGCAAAGAGGTCTTCAGCC
 CTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCATCTACCAGCAGGTGGTGCAGG
 AGTCAAGTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACCTGGCTGAGCTGGCCTCCAGCA
 GTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGCCTCCTGAACCTCGTGCCACCTA
 CATCCCCGACCGCGAGATCACGCCCCCTGAAGACGCTGGAGAAGTGGGCCAGCTGGCCATCGC

CGCCCACAAGAAGGGGATTTATGCCCAGAGGAGAACTGATGCCCAGAAGGTCAAAGAGGATGT
 GGTCA GTTATGCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTCTCCAGGTTTTATGAAGCCTACAAATT
 CTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGTGGCCGTCAACTGGACGGGTGTGTACTT
 TGTGGATGAGCAGGAGCAGGTACTTCTGGAGCTGTCCTTCCCAGAGATCATGGCCGTGTCCAG
 CAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGCTGCTCTGATCTTGGCTGTGCTGCGCCTCA
 CTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGGCGGGGCCCTGTTCTCCGTGTTGGTCTGCAGGGGAGC
 GAAAACGACGGCCCCCAGCTTCACGCTGGCCACCATCAAGGGGGACGAATACACCTTCACCTC
 CAGTAATGCTGAGGACATTCTGTGACCTGGTGGTCACCTTCCTAGAGGGGCTCCGGAAGAGATC
 TAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCCCAACCCCGCAGGCGAGGAGTCAGGCTTCCTCAG
 CTTTGCCAAGGGAGACCTCATCATCTTGACCATGACACGGGCGAGCAGGTCATGAACTCGGG
 CTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACCAAGCAGCGTGGGGACTTCCCCACCGACTGTGTGTA
 CGTCATGCCCCTGTACCATGCCACCTCGTGAGATTGTGGCCCTGGTCACCATGACTCCCGA
 TCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCTTGACGCTGCGAACGGCGGAGCCCGAGGTGCGTGCCAA
 GCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCTATGACTACTTCAGGCCCCACCCAAGCACACGCTGAG
 CCGTGTGTCATGGTGTCCAAGGCCCGAGGCAAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGCGGGAACCGCT
 CAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGCTCCTGGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGGCCTGCCTGGC
 CTTCAATTGCTGTGCTCAAGTACATGGGCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCTCCGTCAATGA
 GCTCACCGACCAGATCTTTGAGGGTCCCCTGAAAGCCGAGCCCCTGAAGGACGAGGCATATGT
 GCAGATCCTGAAGCAGCTGACCGACAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGGGTTGGGAGCT
 GCTCTGGCTGTGCACGGGCCTTTTCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCCCACGTGCAGCGCTT
 CCTGCAGTCCCAGAAAGCACTGCCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCCAGAAAGCCCT
 GAGAAACGGGTCCCGGAAGTACCTCCGCACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCCAGCACAAAGAC
 CACCCAGATTTTCCACAAGGTCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCTTCGAAGTGGAGTC
 CAGCACCAAGGCCAAGGACTTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCAAGTCCTCAGA
 GGGATTACAGCCTCTTTGTCAAAATTGCAGACAAGGTCATCAGCGTTCCTGAGAATGACTTCTT
 CTTTGACTTTGTTGACACTTGACAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGCCCATCAAGGACGGAAT
 TGTGCCCTCACTCACCTACCAGGTGTTCTTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCACGGTGCCAGG
 GAAGGATCCCATGGCCGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCCAAGTATCTCCGAGG
 CTACCACAAGTGCACGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGCTGATCTACAGGGTCAAGTT
 CGAGGAGGACAAGTCTTACTTCCCCAGCATCCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGGTGCCCCAGGA
 CCTTATCCGGCAGGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTCGCCTACTTCAACAAGCA
 CGCAGGGAAGTCCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCCTGAAGCTCATCTTCAAGTGGCCAC
 CTTTGCTCAGCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACCTACGGAGCCAACTTCCCTGAGATCCTCCT
 AATTGCCATCAACAAGTATGGGGTCAGCCTCATCGATCCCAAAACGAAGGATATCCTCACCAC
 TCATCCCTTCACCAAGATCTCCAAGTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACATCACCATTGG
 GAACTTGGTGCGCGGAGCAAACCTGCTCTGCGAGACGTCACTGGGCTACAAGATGGATGACCT

CCTGACTTCCTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCTCCAGGAGCGG
 CAAGTGACCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGAC
 TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGA
 AGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
 GTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
 TAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGCAATTCCCGATTAGGATCTTCCTAGAGCAT
 GGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAAC TACAAGGAACCCCTAGTGATGGAG
 TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCG
 CGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 26)

рAAV2.1-CBA-MYO7A_5'TS

Полная последовательность

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTCCTTGATGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
 AGATCCCTAATCGGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGTGCCACCTGGTCGACATTGATTATTGACT
 AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
 ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCA
 ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAC
 TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
 ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
 TTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCC
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
 TTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGG
 GGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
 CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG
 CGCGGCGGGCGGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAG
 ACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTG
 ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGC
 CGCCATGGTGATTCTTCAGCAGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGATTGGGGCAGGAGTT
 CGACGTGCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGTCCAGGTGGTGGATGA
 TGAAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGCAGAACGCAACGCACATCAAGCCTATGCACCCAC
 GTCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCTGGGGGACCTCAACGAGGCGGGCATCTTGCG
 CAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCATCTACACGTATACGGGCTCCATCCTGGTGGC
 TGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACATCCGCCAGTATACCAACAA
 GAAGATTGGGGAGATGCCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACAACCTGCTACTTCAACATGAA
 ACGCAACAGCCGAGACCAGTGCTGCATCATCAGTGGGGAATCTGGGGCCGGGAAGACGGAGAG

CACAAAGCTGATCCTGCAGTTCCTGGCAGCCATCAGTGGGCAGCACTCGTGGATTGAGCAGCA
GGTCTTGGAGGCCACCCCCATTCTGGAAGCATTTGGGAATGCCAAGACCATCCGCAATGACAA
CTCAAGCCGTTTTCGAAAGTACATCGACATCCACTTCAACAAGCGGGGCGCCATCGAGGGCGC
GAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTCACGTGTCTGTGCGCCAGGCCCTGGATGAAAGGAA
CTACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTGAGGATCAGAAGAAGAAGCTGGGCTT
GGGCCAGGCCTCTGACTACAACACTTTGGCCATGGGTAACTGCATAACCTGTGAGGGCCGGGT
GGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCATGAAGGTGCTCATGTTCACTGACACCGA
GAACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCCTGCACCTGGGCAACCTGCAGTATGAGGC
ACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTTCTTCTTCTCCCCATCGCTGGCCACAGCTGC
ATCCCTGCTTGAGGTGAACCCCCAGACCTGATGAGCTGCCTGACTAGCCGCACCCTCATCAC
CCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCACTGAGCAGGGAACAGGCACTGGACGTGCGCGACGCCTT
CGTAAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTCTGTGTGGATTGTGGACAAGATCAACGCAGCAATTTA
CAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGAACTCTCGCAGGTCCATCGGCCTCCTGGACATCTTTGG
GTTTGAGAACTTTGCTGTGAACAGCTTTGAGCAGCTCTGCATCAACTTCGCCAATGAGCACCT
GCAGCAGTTCTTTGTGCGGCACGTGTTCAAGCTGGAGCAGGAGGAATATGACCTGGAGAGCAT
TGACTGGCTGCACATCGAGTTCAC TGACAACCAGGATGCCCTGGACATGATTGCCAACAAGCC
CATGAACATCATCTCCCTCATCGATGAGGAGAGCAAGTTCCCCAAGGGCACAGACACCACCAT
GTTACACAAGCTGAACTCCCAGCACAAAGCTCAACGCCAACTACATCCCCCCCCAAGAACAACCA
TGAGACCCAGTTTGGCATCAACCATTTTGCAGGCATCGTCTACTATGAGACCCAAGGCTTCCT
GGAGAAGAACCAGACACCCTGCATGGGGACATTATCCAGCTGGTCCACTCCTCCAGGAACAA
GTTTCATCAAGCAGATCTTCCAGGCCGATGTGCGCCATGGGCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGCC
CACACTTAGCAGCCAGTTCAAGCGGTCACTGGAGCTGCTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCCA
GCCCTTCTTTGTGCGATGCATCAAGCCCAATGAGTTCAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCGGCA
CCTGTGCGTGCGCCAGCTGCGGTACTCAGGAATGATGGAGACCATCCGAATCCGCCGAGCTGG
CTACCCCATCCGCTACAGCTTCGTAGAGTTTGTGGAGCGGTACCGTGTGCTGCTGCCAGGTGT
GAAGCCGGCCTACAAGCAGGGCGACCTCCGCGGGACTTGCCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGCT
GGGCACCCACGATGACTGGCAGATAGGCAAAACCAAGATCTTTCTGAAGGACCACCATGACAT
GCTGCTGGAAGTGGAGCGGGACAAAGCCATCACCGACAGAGTCATCCTCCTTCAGAAAGTCAT
CCGGGGATTCAAAGACAGGTCTAACTTTCTGAAGCTGAAGAACGCTGCCACACTGATCCAGAG
GCACTGGCGGGGTCACAACTGTAGGAAGAACTACGGGCTGATGCGTCTGGGCTTCCTGCGGCT
GCAGGCCCTGCACCGCTCCCGGAAGCTGCACCAGCAGTACCGCCTGGCCCGCCAGCGCATCAT
CCAGTTCCAGGCCCCTGCGCGCCTATCTGGTGCGCAAGGCCTTCCGCCACCGCCTCTGGGC
TGTGCTCACCGTGCAGGCCTATGCCCCGGGGCATGATCGCCCGAGGCTGCACCAACGCCTCAG
GGCTGAGTATCTGTGGCGCCTCGAGGCTGAGAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTCG
GAAGGAGATGAGCGCCAAGAAGGCCAAGGAGGAGGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGGC
CCAGCTGGCTCGTGAGGACGCTGAGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGAA

GGAGCTCCTGGAGCAGATGGAAAGGGCCCCGCCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGGAC
 CAAGATGTTTGGCTTCTTGGGGACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTAG
 TGGCTTTGAGGACCTGGAGCGAGGGCGGAGGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCCT
 GCCCCTGCTGACGAGGATGAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAAATTTGCCAAGTTCGCGGCCAC
 CTACTTCCAGGGGACAACCTACGCACTCCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCTA
 CCATGACGACGAGGGTGACCAGCTGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCA
 ATAGAAACTGGGCTTGTCTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTCAATTGAAGGGCGAATTCC
 GATCTTCCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACAAGGA
 ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG
 ACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

(SEQ ID No. 27)

рAAV2.1-MYO7A_3'TS_BGH

Полная последовательность

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCT
 TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
 GGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGA
 AGATCGGAATTCGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
 GCAGCCCTGGCGGTCTGGATCACCATCCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCCAAGTAC
 CACACAGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGACCCCTG
 GGCAAGAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGCCAGCTCCCC
 GAGGGCCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGAAGTCC
 AAGCTCACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGGAGTCCACAGTGCAAGGCAACAGC
 ATGCTGGAGGACCGGGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACTTCATCATCGGCAATGGCATC
 CTGCGGCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCACAACCCC
 TCCAAGAGCAGCTATGCCCGGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGTGTTTCGCCCCC
 TCCGAGAAGTTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCCGGGCTACGCCCCG
 TACTGTGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCCGCCAGCTGG
 CTGGAGCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACATTCATGGATGGG
 ACCACCAAGACCCCTGCTGACGGACTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGCAACGCGCTGGCC
 GACAAGATCTCTCTCAAGGACCGGTTTCGGGTCTCCCTCTACATTGCCCTGTTTGACAAGGTG
 TCCTCCCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTTCATGGACGCCATCTCCAGTGCGAGCAGTACGCC
 AAGGAGCAGGGCGCCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTCCGCAAAGAGGTCTTC
 ACGCCCTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCATCTACCAGCAGGTGGTG
 CGAGGAGTCAAGTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACCTGGCTGAGCTGGCCTCC
 CAGCAGTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGCCTCCTGAACCTCGTGCCC
 ACCTACATCCCCGACCGCGAGATCACGCCCCCTGAAGACGCTGGAGAAGTGGGCCCCAGCTGGCC

ATCGCCGCCACAAGAAGGGGATTTATGCCCAGAGGAGAACTGATGCCCAGAAGGTCAAAGAG
GATGTGGTCAGTTATGCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTCTCCAGGTTTTATGAAGCCTAC
AAATTCTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGTGGCCGTCAACTGGACGGGTGTG
TACTTTGTGGATGAGCAGGAGCAGGTACTTCTGGAGCTGTCCTTCCCAGAGATCATGGCCGTG
TCCAGCAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGCTGCTCTGATCTTGGCTGTGCTGCG
CCTCACTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGCGGGGGCCCTGTTCTCCGTGTTGGTCTCGCAGG
GGAGCGAAAACGACGGCCCCCAGCTTCACGCTGGCCACCATCAAGGGGGACGAATACACCTTC
ACCTCCAGTAATGCTGAGGACATTCTGTGACCTGGTGGTCACCTTCCTAGAGGGGCTCCGGAAG
AGATCTAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCCCAACCCCGCAGGCGAGGAGTCAGGCTTC
CTCAGCTTTGCCAAGGGAGACCTCATCATCCTGGACCATGACACGGGCGAGCAGGTCATGAAC
TCGGGCTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACCAAGCAGCGTGGGGACTTCCCCACCGACTGT
GTGTACGTCATGCCACTGTCAACCATGCCACCTCGTGAGATTGTGGCCCTGGTCACCATGACT
CCCGATCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCTTGCAGCTGCGAACGGCGGAGCCCAGGTGCGT
GCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCCTATGACTACTTCAGGCCCCCACCACAGCACAG
CTGAGCCGTGTATGGTGTCCAAGGCCCCGAGGCAAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGCGGGAA
CCGCTCAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGCTCCTGGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGGCCTGC
CTGGCCTTCATTGCTGTGCTCAAGTACATGGGCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCTCCGTC
AATGAGCTCACCGACCAGATCTTTGAGGGTCCCCTGAAAGCCGAGCCCCTGAAGGACGAGGCA
TATGTGCAGATCCTGAAGCAGCTGACCGACAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGGGTGG
GAGCTGCTCTGGCTGTGCACGGGCCTTTTCCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCCCACGTGCAG
CGCTTCTGTCAGTCCCGAAAGCACTGCCCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCCAGAAA
GCCCTGAGAAACGGGTCCCGGAAGTACCCTCCGCACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCCAGCAC
AAGACCACCCAGATTTTCCACAAGGTCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCTTCGAAGTG
GAGTCCAGCACCAAGGCCAAGGACTTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCAAGTCC
TCAGAGGGATTTCAGCCTCTTTGTCAAAATTGCAGACAAGGTCATCAGCGTTCTTGAGAATGAC
TTCTTCTTTGACTTTGTTCGACACTTGACAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGCCCATCAAGGAC
GGAATTGTGCCCTCACTCACCTACCAGGTGTTCTTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCACGGTG
CCAGGGAAGGATCCCATGGCCGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCAAGTATCTC
CGAGGCTACCACAAGTGACGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGTGATCTACAGGGTC
AAGTTCGAGGAGGACAAGTCTACTTCCCCAGCATCCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGGTGCCC
CAGGACCTTATCCGGCAGGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTCGCCTACTTCAAC
AAGCACGCAGGGAAGTCCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCCTGAAGCTCATCTTCAAGTGG
CCCACCTTTGGCTCAGCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACCTACGGAGCCAACTTCCCTGAGATC
CTCCTAATTGCCATCAACAAGTATGGGGTCAGCCTCATCGATCCCAAAACGAAGGATATCCTC
ACCACTCATCCCTTACCAAGATCTCCAAGTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACATCACC
ATTGGGAACCTTGGTGC GCGGGAGCAAACCTGCTCTGCGAGACGTCACTGGGCTACAAGATGGAT

GACCTCCTGACTTCCTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCTCCAGG
 AGCGGCAAGTGACCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCC
 TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC
 CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG
 AGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAA
 GACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGCAATTCCCGATTAGGATCTTCCTAG
 AGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAAC TACAAGGAACCCCTAGTGA
 TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
 CCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID
 No. 28)

AP

GTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTTCGCATGGGAACCCCAGACCCTGAGT
 ACCCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGGGAAGAATCTGGTGCAGGAATGGC
 TGGCGAAGCGCCAGGGTGCCCGGTACGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATGCAGGCTTCCTGG
 ACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACC
 GAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGA (SEQ ID No. 29)

3XFLAG TAG

GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACG
 ATGACAAG (SEQ ID No. 30)

HA

ATGTATGATGTTTCCTGATTATGCTAGCCTC (SEQ ID No. 31)

В целях этого изобретения кодирующая последовательность ABCA4, MYO7A и CEP290, которые предпочтительно соответственно выбраны из последовательностей, содержащихся в данном документе, или последовательностей, кодирующих такие же аминокислотные последовательности вследствие вырожденности генетического кода, функционально связана с последовательностью промотора, способного к регулированию его экспрессии в сетчаточной клетке млекопитающих, в особенности в фоторецепторных клетках. Пригодные промоторы, которые могут быть использованы в соответствии с изобретением, включают в себя промотор цитомегаловируса, промотор родопсина, промотор родопсинкиназы, промотор межфоторецепторного ретинол-связывающего белка, промотор вителиформной макулярной дистрофии 2, их фрагменты и варианты, сохраняющие транскрипционную промоторную активность.

Вирусные системы доставки включают в себя, но не ограничены ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, псевдотипированные AAV векторы, герпесные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы.

Псевдотипированные AAV векторы являются векторами, которые содержат геном одного серотипа AAV в капсиде второго серотипа AAV; например AAV2/8 вектор содержит AAV8 капсид и AAV 2 геном (Auricchio et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10(26):3075-81). Такие векторы также известны как химерные векторы. Другие примеры систем доставки включают в себя *ex vivo* системы доставки, которые включают в себя, но не ограничены ими, способы ДНК трансфекции, такие как электропорация, ДНК биолистика, липид-опосредованная трансфекция, компактная ДНК-опосредованная трансфекция.

Конструкция AAV вектора может быть выполнена в соответствии с процедурами и с использованием технологий, которые известны специалисту в данной области. Теория и практика для аденоассоциированной вирусной векторной конструкции и использование в терапии проиллюстрированы в нескольких научных и патентных публикациях (последующая библиография включена в данный документ посредством ссылки: Flotte T.R. Adeno-Associated virus-based gene therapy for inherited disorders. *Pediatr Res.* 2005 Dec; 58(6): 1143-7; Goncalves M.A. Adeno-Associated virus: from defective virus to effective vector, *Virol J.* 2005, May 6; 2:43; Surace E.M., Auricchio A. Adeno-Associated viral vectors for retinal gene transfer. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003, Nov; 22(6):705-19; Mandel R.J., Manfredsson F.P., Foust K.D., Rising A., Reimsnider S., Nash K., Burger C. Recombinant adeno-Associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. *Mol. Ther.* 2006, Mar; 13(3):463-83).

Пригодные формы введения фармацевтической композиции, содержащей AAV векторы, включают в себя, но не ограничены ими, инъекционные растворы или суспензии, лосьоны для глаз и офтальмические мази. В предпочтительном варианте осуществления вектор AAV введен субретинальной инъекцией, например инъекцией в субретинальное пространство, в переднюю камеру или в ретробульбарное пространство. Предпочтительно вирусные векторы доставлены посредством субретинального подхода (как описано в Bennicelli J. et al. *Mol. Ther.* 2008, Jan 22; Reversal of Blindness in Animal Models of Leber Con-

genital Amaurosis Using Optimized AAV2-mediated Gene Transfer).

Дозы вируса для использования в терапии должны быть в каждом конкретном случае определены в зависимости от пути введения, тяжести заболевания, общих состояний пациентов и других клинических параметров. В целом, пригодные дозировки будут варьироваться от 10^8 до 10^{13} вг (векторных геномов)/глаз.

Продукция вектора AAV.

AAV векторы продуцировали посредством AAV векторной сердцевины TIGEM тройной трансфекцией клеток HEK293 с последующими двумя циклами очистки с CsCl_2 (54). Для каждого вирусного препарата, физические титры [копии генома (КГ/мл)] определяли усреднением титра, полученного дот-блот анализом (55) и количественным определением с ПЦР с использованием TaqMan (54) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

AAV инфекция клеток HEK293.

Клетки HEK293 поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ L-глутамина (GIBCO, Invitrogen S.R.L., Милан, Италия). Клетки сеяли слоем на шестилуночные планшеты с плотностью 2×10^6 клеток/лунку и трансфицировали через 16 ч с 1,3 мкг плазмиды-помощника pDeltaF6, которая содержит вспомогательные гены Ad (56), с использованием кальций-фосфатного способа. Через 5 ч, клетки промывали один раз с DMEM и инкубировали с AAV2/2 векторами (m.o.i: 10^5 КГ/клетку каждого вектора; коинфицирование 1:1 с двойными векторами AAV приводило в результате к 2×10^5 общего количества КГ/клетку) в конечном объеме 700 мкл бессывороточной DMEM. Через два часа к клеткам добавляли 2 мл полной DMEM. Клетки собирали через 72 ч после инфекции для Вестерн-блот анализа.

Животные модели.

Это исследование осуществляли в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных NIH, Положением по использованию животных в офтальмических и зрительных исследованиях и Постановлением в области здравоохранения итальянского министерства здравоохранения. Мышей содержали в помещении для животных Института генетики и биофизики (Неаполь, Италия) и поддерживали при 12-часовом цикле дня и ночи (с подверганием 10-50 люкс во время световой фазы). Мышей C57BL/6 и Balb/c приобретали у Harlan Italy SRL (Удина, Италия). Мышей-альбиносов Abca4^{-/-} генерировали посредством последовательных скрещиваний и обратных скрещиваний с мышами Balb/c (гомозиготных по Rpe65 Leu450) (57) и сохраняли инбредными. Разведение выполняли скрещиванием гомозиготных мышей. Пигментированных sh14626SB/4626SB (называемых sh1^{-/-}) мышей импортировали из Wellcome Trust Sanger Institute (Кембридж, СК, любезный подарок Dr. Karen Steel) и обратно скрещивали два раза с мышами CBA/Ca, приобретенными у Harlan Italy SRL (Удина, Италия) для получения гетерозиготных sh1^{+/+}4626SB (называемых sh1^{+/+}) мышей для размножения колонии. Мышей сохраняли перекрестно скрещенными; выращивание выполняли скрещиванием гетерозиготных самок с гетерозиготными самцами. Пигментированные мыши sh1, используемые в этом исследовании, являлись или пораженными Ушера 1В (sh1^{-/-}), или непораженными (sh1^{+/+} и sh1^{+/+}). Генотип для КГ аллеля выполняли анализом ПЦР геномной ДНК (выделенной из конца мышинного хвоста) с последующим ДНК секвенированием. Праймеры, используемые для амплификации ПЦР, являлись следующими: Fw1 (GTGGAGCTTGACATCTACTTGACC) и Rev3 (AGTGACCTCATGACTCTGC), которые генерируют продукт из 712 п.о., который был секвенирован с Fw1 праймером. Самка Крупной белой свиньи, используемая в этом исследовании, была зарегистрирована как чистопородная в LWHerd Book Итальянской национальной ассоциации заводчиков свиней (Azienda Agricola Pasotti, Имола, Италия).

Субретинальные инъекции векторов AAV мышам и свиньям.

Мышей (4-5 недельный возраст) анестезировали с внутривенной инъекцией 2 мл/100 г массы тела авертина [1,2 5% мас./об. 2,2,2-трибромэтанола и 2,5% об./об. 2-метил-2-бутанола (Sigma-Aldrich, Милан, Италия)] (58), затем AAV2/8 векторы доставляли субретинально через трансклеральный трансохиоидальный подход, как описано Liang et al (59). Все глаза подвергали обработке с 1 мкл раствора вектора. Доставленные дозы AAV2/8 (КГ/глаз) варьируются в различных мышинных экспериментах, как это описано в разделе "Результаты". AAV2/1-CMV-человеческую тирозиназу (60) (доза: 2×10^8 КГ/глаз) или AAV2/5-CMV-EGFP (кодирующая EGFP нормального размера, доза: 4×10^8 КГ/глаз) добавляли к AAV2/8 векторному раствору, который субретинально доставляли альбиносам (Abca4^{-/-} и BALB/c) (фиг. 6В, 7, 8) или пигментированным мышам sh1 (фиг. 10, 11) соответственно. Это позволило нам пометить RPE в пределах трансуцированной части глазной чаши, которую впоследствии разрезали и анализировали. (фиг. 6В, 7, 8, 10, 11).

Субретинальную доставку векторов AAV в свиной сетчатке выполняли, как описано ранее (11). Все глаза подвергали обработке с 100 мкл раствора вектора AAV2/8. Доза AAV2/8 составляла 1×10^{10} (фиг. 3В) или 1×10^{11} КГ каждого вектора/глаз (фиг. 5В и 16) и совместная инъекция двойными векторами AAV приводила в результате к общей дозе 2×10^{10} КГ/глаз или 2×10^{11} КГ/глаз соответственно.

Вестерн-блот анализ.

Образцы (клетки HEK293, сетчатки или глазные чаши) для Вестерн-блот анализа лизировали в бу-

фере RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% NA-дезоксихолата, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% DCH) для экстракции белков EGFP и MYO7A или в буфере SIE (250 mM сахарозы, 3 mM имидазола pH 7,4, 1% этанола и 1% NP-40) для экстракции белка ABCA4.

Свиные образцы (подвергаемые лечению области сетчатки, а также все слои RPE) лизировали в буфере RIPA для экстракции MYO7A из слоев RPE и в буфере SIE для экстракции MYO7A и ABCA4 из сетчатки.

Буферы для лизиса дополняли с ингибиторами протеазы (таблетки полной смеси ингибиторов протеаз, Roche, Милан, Италия) и 1 mM фенилметилсульфонилла. После лизиса образцы EGFP и MYO7A денатурировали при 99°C в течение 5 мин в 1X буфере для образца Laemli; образцы ABCA4 денатурировали при 37°C в течение 15 мин в 1X буфере для образца Laemli, дополненном 4M мочевиной. Лизаты разделяли посредством 7% (образцы ABCA4 и MYO7A) или 12% (образцы EGFP) электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии DCH. Антитела, используемые для иммуноблоттинга, являлись следующими: анти EGFP (sC-8 334, Санта-Круз, Даллас, Техас, США, 1:500); анти-3xflag (A8592, Sigma-Aldrich, 1:1000); анти-Myo7a (поликлональное, Primm Sri, Милан, Италия, 1:500), генерированное с использованием пептида, соответствующего аминокислотам 941-1070 человеческого белка MYO7A; антитело анти-NA (PRB-101P-200, NA.11, Covance, Принстон, Нью-Джерси, США); анти-β тубулин (T5201, Sigma Aldrich, 1:10000); антифиламин ((catalog#4762, Cell Signaling Technology, Данверс, Массачусетс, США, 1:1000); антидисферлин (дисферлин, клон Ham1/7B6, MONX10795, Tebu-bio, Ле Пере-ан-Ивелин, Франция, 1:500). Количественное определение полос EGFP, ABCA4 и MYO7A, детектированных Вестерн-блоттингом, выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ (бесплатная загрузка доступна на <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Экспрессию ABCA4 и MYO7A нормализовали по филламину или дисферлину для *in vitro* и *in vivo* экспериментов соответственно. EGFP экспрессию нормализовали по β тубулину или нг белков для *in vitro* и *in vivo* экспериментов соответственно. Различные белки использовали для нормализации на основе сходства их молекулярного веса с весом различных трансгенных продуктов.

Фотография глазного дна.

Изображение глазного дна в реальном времени выполняли посредством расширения глаз C57BL/6 с каплей тропикамида 1% (Visufarma, Рим, Италия) и последующего стимулирования глаза со вспышкой 300 W. Фотографии глазного дна с использованием сетчаточной камеры Topcon TRC-50IX, соединенной с цифровой фотокамерой Nikon D1H с прибором с зарядовой связью (Topcon Medical System, Окленд, Нью-Джерси, США).

Гистология, световая и флуоресцентная микроскопия.

Для оценки EGFP экспрессии в гистологических срезах глаза мышей C57BL/6 или Крупных белых свиней (11) энуклеировали через один месяц после инъекции AAV2/8. Мышинные глаза фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи и подвергали фильтрованию с 30% сахарозой в течение ночи; роговицу и хрусталик затем разрезали и глазные чаши заливали в соединение с оптимальной температурой разрезания (матрица O.C.T., Kaltek, Падуя, Италия). Свиные глаза фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 48 ч, подвергали фильтрованию с 10% сахарозой в течение 4 ч, 20% сахарозой в течение 4 ч и в заключение с 30% сахарозой в течение ночи. Затем роговицу, хрусталик и стекловидное тело разрезали и EGFP-позитивные участки глазных чаш заливали в соединение с оптимальной температурой разрезания (матрица O.C.T., Kaltek). Последовательные криосрезы (толщина 10 мкм) нарезали вдоль горизонтального меридиана и постепенно распределяли по предметным стеклам. Изображения сетчаточной гистологии регистрировали с использованием Zeiss AxioCam (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). Для анализа расположения меланосомы в RPE пигментированных мышей sh1 глаза энуклеировали через 2 месяца после инъекции AAV, фиксировали в 2% глутаральдегиде-2% параформальдегиде в 0,1M фосфатном буфере в течение ночи, промывали в 0,1M фосфатном буфере и разрезали под флуоресцентным микроскопом. EGFP-позитивные участки глазных чаш заливали в Araldite 502/EMbed 812 (catalog #13940, Araldite 502/EMbed 812 KIT, Electron Microscopy Sciences, Хэтфилд, Пенсильвания, США). Полутонкие (0,5-мкм) срезы нарезали поперечно на ультратоме Leica RM2235 (Leica Microsystems, Банноберн, Иллинойс, США), установленном на предметных стеклах, и окрашивали с тканевым красителем Эпокси (catalog #14950, Electron Microscopy Sciences). Меланосомы подсчитывали посредством маскированного оператора, анализируя 10 различных полей/глаз под световым микроскопом при увеличении 100X. Сетчаточные изображения получали с использованием Zeiss AxioCam (Carl Zeiss).

Электронная микроскопия и иммунозолотое мечение.

Для анализов электронной микроскопией собирали глаза у Abca4^{-/-} или sh1 мышей через 3 и 2 месяца после инъекции AAV соответственно. Глаза фиксировали в 0,2% глутаральдегиде-2% параформальдегиде в 0,1M PHEM буфере pH 6,9 (240 mM PIPES, 100 mM HEPES, 8 mM MgCl₂, 40 mM EGTA) в течение 2 ч и затем промывали в 0,1M PHEM буфере. Глаза затем разрезали под световым или флуоресцентным микроскопом для отбора позитивных к тирозиназе или EGFP-участкам глазных чаш альбиносов (Abca4^{-/-} и BALB/c) и пигментированных мышей sh1 соответственно. Трансдуцированный участок глазных чаш впоследствии заливали в 12% желатина, пропитывали 2,3M сахарозой и замораживали в жид-

ком азоте. Нарезали криосрезы (50 нм) с использованием ультрамикротомы Leica EM FC7 (Leica Microsystems) и предпринимали меры предельной осторожности для выравнивания соединительных ресничек PR в продольном направлении. Измерения толщины RPE и подсчеты липофусциновых гранул в Abca4-/- глазах выполняли посредством маскированного оператора (Roman Polishchuk) с использованием программного обеспечения iTEM (Olympus SYS, Гамбург, Германия). Кратко, толщину RPE измеряли по меньшей мере в 30 различных областях вдоль длины образца с использованием инструмента "Arbitrary Line" программного обеспечения iTEM. Модуль "Touch count" программного обеспечения использовали для подсчета количества липофусциновых гранул в 25 мкм² областях, распределенных в случайном порядке через слой RPE. Плотность гранулы была выражена в виде количества гранул в расчете на 25 мкм². Иммунозолотой анализ, направленный на тестирование экспрессии ABCA4-НА в Abca4-/- образцах после доставки вектора AAV, выполняли посредством инкубирования криосрезов последовательно с моноклональным антителом анти-НА (MMS-101P-50, Covance, 1:50), кроличьим антимышиным IgG и 10-нм конъюгированного с частицей золота белка А. Для количественного определения расположения родопсина в соединительных ресничках PR sh1, криосрезы мышей sh1 последовательно инкубировали с антителом антиродопсин (1D4, ab5417, Abcam, Кембридж, СК, 1:100), кроличьим анти-мышинным IgG и 10-нм конъюгированного с частицами золота белка А. Количественное определение золотой плотности родопсина в соединительных ресничках выполняли посредством маскированного оператора с использованием программного обеспечения iTEM (Olympus SYS). Кратко, модуль "Touch count" программного обеспечения iTEM использовали для подсчета количества частиц золота в расчете на ресничку, которые были нормализованы по периметру (нм) реснички, которую измеряли с использованием "Closed polygon tool". Плотность золота была выражена в виде частиц золота/нм. Иммуномеченные с золотом криосрезы анализировали под электронным микроскопом FEI Tecnai-12 (FEI, Эйндховен, Нидерланды), оборудованным с камерой Veletta CCD для получения цифрового изображения.

Электрофизиологические анализы.

Для оценки восстановления от световой десенсибилизации глаза стимулировали с 3 световыми вспышками 1 кд/с/м² и затем десенсибилизировали подверганием воздействию постоянного света (300 кд/м²) в течение 3 мин. Затем глаза стимулировали с течением времени с использованием предсенсибилизирующей вспышки (1 кд/с/м²) через 0, 5, 15, 30, 45 и через 60 мин после десенсибилизации. Восстановление активности палочек оценивали выполнением соотношения между b-волной, генерированной после десенсибилизации (в различные временные точки), и волной, генерированной предварительной десенсибилизацией. Восстановление от световой десенсибилизации оценивали у мышей Abca4-/- 2-месячного возраста на 6 неделю после лечения (фиг. 13).

Статистический анализ.

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (с.о.с). Статистическое Р-значение <0,05 считалось значимым. Использовали однопроходный ANOVA с апостериорной процедурой множественного сравнения для сравнения данных, отображенных на фиг. 2 (р ANOVA: А. 0,0002; В. 0,0015; С. 2×10^{-7}); фиг. 8В (р ANOVA: 0,076); фиг. 11В (р ANOVA: 0,5). После того как липофусциновые гранулы (фиг. 7В) и меланосомы (фиг. 10В) были подсчитаны, подсчеты анализировали на основе отклонения от отрицательных биномиальных обобщенных линейных моделей (61) (фиг. 7В: р величина анализов отклонения 0,03794; фиг. 10В: р величина анализа отклонения $< 2 \times 10^{-10}$). Статистически значительные различия между группами определяли с апостериорной процедурой множественного сравнения, как обозначено звездочками на фигурах.

Результаты.

Генерация AAV векторов нормального размера, увеличенного размера и двойных AAV векторов.

Авторы изобретения генерировали AAV векторы увеличенного размера (OZ), двойные AAV транс-сплайсинг (TS) и гибридные векторы, которые включают в себя или репортерные EGFP, терапевтические ABCA4-3xflag или кодирующие MYO7A-НА последовательности. Авторы изобретения также генерировали двойные AAV транс-сплайсинг (TS) и гибридные векторы, которые включают в себя терапевтический CER290, меченный на его С-конце с НА меткой. Рекомбиногенные последовательности, включенные в двойные AAV гибридные векторы, являлись основанными на или ранее сообщенной области транскрипта щелочной фосфатазы (AP, двойные AAV гибридные AP) (39), или последовательности из 77 п.о. из генома фага F1 (AK, двойные AAV гибридные AK), которые, как было обнаружено авторами изобретения, являлись рекомбиногенными в предшествующих экспериментах (Colella и Auricchio, неопубликованные данные). Авторы изобретения также генерировали двойные AAV перекрывающиеся (OV) векторы для ABCA4, MYO7A и CER290. Авторы изобретения не генерировали двойные AAV OV векторы относительно EGFP из-за того, что эффективность этого основана на транскрипте, специфичном к перекрыванию для восстановления (38) и, следовательно, не может быть экстраполирована с одного гена в другой. Вместо этого для EGFP авторы изобретения генерировали одиночные AAV векторы нормального размера (NS) для сравнения уровней экспрессии транскрипта из различных стратегий. Конструкты, генерированные для продуцирования всех векторов AAV, используемых в этом исследовании, приведены в таблице, и схематическое отображение различных подходов отображено на фиг. 1.

Авторы изобретения использовали AAV2/2 векторы для *in vitro* экспериментов с убиквитарными промоторами цитомегаловируса (CMV) или куриного β -актина (CBA), который эффективно трансдуцирует клетки HEK293 (40). В добавление, так как использование гетерологичных ITR из серотипов AAV 2 и 5 может увеличить продуктивную повторную сборку двойных векторов AAV (51), авторы изобретения также генерировали двойные AAV АК векторы с гетерологичными ITR (фиг. 17а), кодирующими AB-CA4 и MYO7A. AAV векторы с гетерологичными ITR упаковывали в AAV капсиды из серотипа 2 и тестировали *in vitro*.

В экспериментах, выполненных *in vivo* в сетчатке, авторы изобретения использовали векторы AAV2/8, которые эффективно трансдуцируют RPE и PR (10-12), но плохо инфицируют клетки HEK293 и или убиквитарные промоторы CBA и CMV (11), или промоторы RPE-специфичной вителлиформной макулярной дистрофии 2 (VMD2) (41) или PR-специфичного родопсина (RHO) и родопсинкиназы (RHOX) (10) (таблица).

Двойные AAV векторы позволяют высокие уровни трансдукции *in vitro*.

Авторы изобретения первоначально сравнивали эффективность различных OZ, двойных AAV OV, TS и гибридных AP и АК стратегий AAV-опосредованной трансдукции большого гена *in vitro* инфицированием клеток HEK293 с AAV2/2 векторами [множественность инфекции, m.o.i.: 10^5 копий генома (КГ)/клетку каждого вектора] с убиквитарными промоторами (CMV для EGFP, ABCA4-3xflag и CEP2 90-NA и CBA для MYO7A-NA).

Клеточные лизаты анализировали Вестерн-блоттингом с анти-EGFP (фиг. 2А), -3xflag (для детектирования ABCA4-3xflag, фиг. 2В), -MYO7A (фиг. 2С) и -NA (для детектирования CEP290-NA) (фиг. 12А) антителами. Иллюстративные Вестерн-блоттинги продемонстрированы на фиг. 2А-С и 12А. Все стратегии приводили в результате к экспрессии белков ожидаемого размера. Как было предсказано, не наблюдали полос ожидаемого размера, когда только один из двойных векторов AAV использовали для инфекции (фиг. 2А-С и 12А). Количественное определение экспрессии трансгена (фиг. 2D-F), продемонстрировало, что подход с двойным AAV гибридным AP приводил в результате к наиболее низким уровням экспрессии трансгена, тогда как двойной AAV OV, TS и гибридный АК подходы были более эффективными, чем AAV OZ подход. Двойной AAV TS и гибридный АК подходы подтвердили их способность эффективно экспрессировать большие гены также в случае CEP290 (фиг. 12В). В добавление, использование двойных AAV АК векторов с гетерологичными ITR приводило в результате к экспрессии полноразмерных белков ABCA4 и MYO7A *in vitro* (фиг. 17).

Двойные AAV TS и гибридные АК, но не OV векторы трансдуцируют мышинные и свиные фоторецепторы.

Авторы изобретения затем оценили каждую из основанных на AAV систем трансдукции большого гена в мышинной сетчатке. Для тестирования двойного AAV OV, который являлся трансген-специфичным, авторы изобретения использовали терапевтические ABCA4 и MYO7A гены (фиг. 3). Авторы изобретения использовали EGFP для оценки AAV OZ и двойного AAV TS, гибридного AP и АК подходов (фиг. 4). Вестерн-блот анализ сетчаточных лизатов через один месяц после субретинальной доставки C57BL/6 мышам двойных AAV OV векторов (доза каждого вектора/глаз: $1,3 \times 10^9$ КГ), кодирующих ABCA4-3xflag из убиквитарного CMV промотора, выявила устойчивую экспрессию белка (фиг. 3А). Для определения того, какой клеточный тип в сетчатке экспрессировал ABCA4, авторы изобретения использовали двойные AAV OV векторы, которые содержали или PR-специфичные RHO и RHOX или RPE-специфичные к VMD2 (доза каждого вектора/глаз: 1×10^9 КГ) промоторы. Авторы изобретения детектировали экспрессию белка ABCA4 в сетчатках, инъецированных с VMD2, но не в сетчатках, содержащих промоторы RHO и RHOX (фиг. 3А). Эти результаты также подтверждали на сетчатке Крупной белой свиньи. Свиная сетчатка является отличной моделью для оценки эффективности вектора из-за ее размера, который подобен человеческой сетчатке и из-за того, что она обогащена колбочками, которые сконцентрированы в линейной области, плотность колбочек в которой сопоставима с плотностью пятна приматов (11). Авторы изобретения инъецировали Крупную белую свинью субретинально с двойными AAV OV векторами, кодирующими ABCA4-3xflag (доза каждого вектора/глаз: 1×10^{10} КГ), и наблюдали экспрессию белка ABCA4 с CMV, но не с RHO промотором (фиг. 3В). Подобным образом, субретинальное введение двойных AAV OV векторов, кодирующих MYO7A-NA, приводило в результате к слабой экспрессии белка MYO7A в мышинной сетчатке с убиквитарным CBA (доза каждого вектора/глаз: $2,5 \times 10^9$ КГ) и отсутствию обнаруживаемой экспрессии с RHO (доза каждого вектора/глаз: $3,2 \times 10^9$ КГ) промотором (фиг. 3С). В общем, эти данные предполагали, что двойной AAV OV подход был более эффективным для переноса больших генов в RPE, чем PR, который является главной мишенью генной терапии для IRD, такой как STGD и USH1B.

Для обнаружения основанной на AAV стратегии, которая эффективно трансдуцирует большие гены в PR, авторы изобретения оценивали сетчаточные трансдукционные свойства AAV OZ и двойного AAV TS, гибридного AP и АК подходов. Авторы изобретения первоначально использовали EGFP, который позволял нам легко локализовать экспрессию трансгена в различных сетчаточных клеточных типах, включая PR, а также соответствующим образом сравнить уровни основанной на AAV трансдукции

большого трансгена с уровнями единичного AAV NS вектора. Мышей C57BL/6 инъецировали субретинально с AAV NS, OZ и двойными AAV TS и гибридными AP и АК векторами (доза каждого вектора/глаз: $1,7 \times 10^9$ КГ), все из которых кодируются EGFP под транскрипционным контролем CMV промотора. После одного месяца фотографии глазного дна продемонстрировали, что наиболее высокие уровни флуоресценции были получены с подходами с AAV NS и двойным AAV TS и гибридным АК (фиг. 15). Анализ с флуоресцентным микроскопом сетчаточных криосрезов продемонстрировал, что обнаруживаемые уровни трансдукции RPE или PR можно было наблюдать в: 77% (10/13) сетчаток, инъецированных с AAV NS и OZ векторами; 92% (12/13) сетчаток, инъецированных с двойными AAV TS, гибридными AP и АК векторами. Фиг. 4 демонстрирует наилучшим образом трансдуцированные сетчатки из каждой из этих групп. Наиболее устойчивые уровни PR трансдукции получали с AAV NS и двойным AAV TS и гибридным АК подходами.

Авторы изобретения затем оценивали уровни PR-специфичной трансдукции у мышей C57BL/6 после субретинального введения двойных AAV TS и гибридных АК векторов, что оказывается наиболее перспективным для восстановления большого гена в PR, а также AAV NS векторах для сравнения (доза каждого вектора/глаз: $2,4 \times 10^9$ КГ). Все векторы кодировали EGFP под транскрипционным контролем PR-специфичного RHO промотора. Через один месяц после введения вектора сетчатки разрезали в крио условиях и анализировали под флуоресцентным микроскопом (фиг. 5A). Все подходы приводили в результате к высоким уровням PR трансдукции, которые, по-видимому, являлись более согласующимися с единичным AAV NS вектором. Авторы изобретения обнаружили PR трансдукцию в: 100% (6/6) сетчаток, инъецированных с AAV NS; 60% (9/15) сетчаток, инъецированных с двойными AAV TS; 71% (10/14) сетчаток, инъецированных с двойным AAV гибридным АК. Фиг. 5A демонстрирует наилучшим образом трансдуцированные сетчатки из каждой из этих групп. Таким образом, авторы изобретения делают вывод, что двойная AAV TS и гибридная АК стратегии позволяют эффективную мышиную PR трансдукцию, хотя с уровнями, которые являются более низкими, чем уровни, полученные с NS AAV. Авторы изобретения затем подтвердили, что субретинальное введение двойного AAV TS и гибридного АК векторов (доза каждого вектора/глаз: 1×10^{11} КГ; EGFP-позитивные сетчатки из общего числа инъецированных: 2/2 двойных AAV TS; 2/2 двойных AAV гибридных АК) трансдуцировало PR Крупных белых свиней (фиг. 5B).

В добавление, субретинальная доставка в свиной сетчатке двойных AAV TS и гибридных АК векторов (доза каждого вектора/глаз: 1×10^{11}) приводила в результате к эффективной экспрессии как полноразмерного ABCA4-3xflag специфично в PR (фиг. 16a), так и полноразмерного MYO7A-НА в RPE и PR (фиг. 16b). Что интересно, двойные AAV гибридные АК векторы приводили в результате к более сопоставимой экспрессии больших белков ABCA4 и MYO7A в PR по сравнению с двойными AAV TS векторами (фиг. 16).

Двойные AAV векторы улучшают сетчаточный фенотип мышинных моделей STGD и USH1B.

Для понимания того, могут ли уровни PR трансдукции, полученной с двойным AAV TS и гибридным АК подходами, быть терапевтически релевантными, авторы изобретения исследовали их в сетчатке из двух мышинных моделей IRD, STGD и USH1B, вызванных мутациями в больших генах ABCA4 и MYO7A соответственно.

Хотя мышинная модель Abca4^{-/-} не подвергается тяжелой PR дегенерации (42), отсутствие ABCA4-кодируемого переносчика полностью -транс- ретиналя в наружных сегментах PR (43-44) вызывает накопление липофусцина в PR, а также в RPE, как результат PR фагоцитоза посредством RPE (45). Как следствие, как количество липофусциновых гранул в RPE, так и толщина RPE клеток больше у мышей Abca4^{-/-}, чем у контрольных мышей (45). Кроме того мышинная модель Abca4^{-/-} характеризуется замедленной темновой адаптацией (57, 62). Так как ABCA4 экспрессируется специфично в PR, авторы изобретения генерировали двойные AAV TS и гибридные АК векторы, кодирующие ABCA4-3xflag под транскрипционным контролем RHO промотора. Эти векторы инъецировали субретинально мышам C57BL/6 дикого типа (доза каждого вектора/глаз: $3-5 \times 10^9$ КГ) и через один месяц сетчатки лизировали и анализировали с Вестерн-блоттингом с анти-3xflag антителами. Оба подхода приводили в результате к устойчивым, все еще варьирующимся уровням экспрессии ABCA4-3xflag. Уровни экспрессии ABCA4-3xflag были более соответствующими в сетчатке, подвергаемой лечению с двойным AAV гибридными АК векторами (фиг. 6A). Эти результаты были подтверждены на Крупных белых свиньях (данные не приведены). В добавление, мышей-альбиносов Abca4^{-/-} возрастом один месяц инъецировали субретинально с двойными AAV гибридными АК RHO-ABCA4-НА векторами (доза каждого вектора/глаз: $1-3 \times 10^9$ КГ). Через три месяца глаза собирали, и иммуно-электронный микроскопический анализ с антителами анти-гематоглинин (НА) сетчаточных срезов подтвердил, что иммунозолотые частицы золота были корректным образом локализованы только в наружных сегментах PR у животных, которых инъецировали с комбинацией 5' и 3' двойных AAV гибридных АК векторов (фиг. 6B). Для оценки функциональности белка ABCA4, экспрессируемого двойными векторами, авторы изобретения также выполняли просвечивающую электронную микроскопию для оценки присутствия и количества липофусциновых гранул RPE (фиг. 7) и толщины RPE (фиг. 8). И то и другое было больше в сетчатке Abca4^{-/-} мышей, инъецирован-

ных с контрольными векторами, чем в сетчатке выровненных по возрасту контролей Balb/C дикого типа и было снижено или нормализовано в глазах, инъецированных с терапевтическими двойными AAV TS или гибридными АК векторами (фиг. 7В и 8В). В добавление, способность фоторецепторов Abca4-/- восстанавливаться от световой десенсибилизации была значительно улучшена в сетчатках, подвергаемых лечению с терапевтическими векторами при сравнении контрольными сетчатками (фиг. 13).

Авторы изобретения затем тестировали уровни PR трансдукции и эффективности двойного AAV-опосредованного MYO7A переноса генов в сетчатке sh1 мышей, наиболее часто используемой модели USH1B (23-24, 46-48). У мышей sh1 недостаток в моторном Myo7a вызывает неправильное расположение RPE меланосом (47), которые не проникают в RPE микроворсинки, и накопление родопсина в PR соединительных ресничках (48). Так как MYO7A экспрессируется как в RPE, так и в PR (22-23), авторы изобретения затем использовали двойные AAV TS и гибридные АК векторы, экспрессирующие MYO7A-НА под транскрипционным контролем убиквитарного СВА промотора. Мышей C57BL/6 дикого типа возрастом один месяц инъецировали с двойными векторами AAV (доза каждого вектор/глаз: $1,7 \times 10^9$ КГ) и лизаты глазной чаши оценивали через один месяц с использованием Вестерн-блот анализа с анти-НА антителами. Результаты демонстрировали подобным образом устойчивые и сопоставимые уровни экспрессии MYO7A в сетчатках, подвергаемых лечению с обоими подходами (фиг. 9). Используя преимущество нашего анти-MYO7A антитела, способного распознавать как мышинный, и человеческий MYO7A, мы сравнили уровни MYO7A, достигаемые после доставки двойных векторов AAV, в sh1-/- глазе, с уровнями, экспрессируемыми эндогенно в sh1+/+ глазе (фиг. 14). Мы использовали как СВА (фиг. 14, левая панель, доза каждого вектор/глаз: $1-6 \times 10^9$ КГ), так и RHO промоторы (фиг. 14, правая панель, доза каждого вектора/глаз: 2×10^9 КГ) для различения MYO7A экспрессии, достигаемой как в PR, так и в RPE от экспрессии в PR отдельно: первая составляла около 20% (фиг. 14, левая панель) и последняя вплоть до около 50% эндогенных Myo7a (фиг. 14, правая панель). Наш анализ дополнительно демонстрирует, что уровни MYO7A экспрессии, достигаемые в PR двойными AAV гибридными АК, являются более высокими, чем уровни, полученные с двойными AAV TS векторами, несмотря на то что количество трансдуцированных сетчаток, является подобным (TS-MYO7A: 3 сетчатки позитивные из в общем 8 инъецированных; АК-MYO7A: 4 сетчатки позитивные из в общем 8 обработанных; фиг. 14, правая панель).

Для тестирования способности MYO7A, экспрессируемого из двойных векторов AAV, восстанавливать дефекты sh1-/- сетчатки, авторы изобретения затем субретинально инъецировали наборы СВА двойных AAV TS и гибридных АК векторов (доза каждого вектора/глаз: $2,5 \times 10^9$ КГ) мышам sh1 возрастом один месяц. Авторы изобретения оценивали RPE меланосому (фиг. 10) и расположение родопсина (фиг. 11) посредством анализа полутонкого сетчаточного среза и иммуноэлектронной микроскопии, соответственно. В отличие от непораженных sh1+/-, sh1-/-меланосомы не проникают в RPE микроворсинки после доставки контрольных векторов (каждая единичная 5' половина стратегии с двойными AAV, фиг. 10). Количество RPE меланосом, корректно расположенных апикально, было значительно улучшено после доставки или двойных AAV TS или гибридных АК векторов, кодирующих MYO7A (фиг. 10В). Примечательно, что авторы изобретения также обнаружили, что экспрессия MYO7A, опосредованная двойными AAV TS и гибридными АК векторами, снижала накопление родопсина в соединительной ресничке sh1-/- PR (фиг. 11).

Обсуждение.

Тогда как AAV-опосредованная генная терапия является эффективной в животных моделях и у пациентов с наследственными ослепляющими состояниями (5-9, 49), ее применение к заболеваниям, воздействующим на сетчатку и требующим переноса генов больше чем 5 т.н. (называемые большие гены), ингибировано ограниченной способностью AAV переносить груз. Для преодоления этого авторы изобретения сравнили эффективность различных основанных на AAV стратегий для трансдукции большого гена, включающих: AAV OZ и двойные AAV OV, TS и гибридные подходы *in vitro* и в сетчатке мышей и свиней. В предшествующих экспериментах авторы изобретения выбрали последовательность из 77 п.о. из генома фага F1, которую авторы изобретения идентифицировали на ее рекомбиногенные свойства и использовали в двойном гибридном подходе (АК, двойные AAV гибридные АК).

In vitro и *in vivo* результаты авторов изобретения демонстрируют, что двойная AAV гибридная АК неожиданно превосходит двойную AAV гибридную AP и что все двойные AAV стратегии, которые авторы изобретения тестировали (за исключением двойной AAV гибридной AP), превосходят AAV OZ векторы в отношении уровней трансдукции. Это может быть объяснено гомогенным размером двойного AAV генома популяции при сравнении с OZ геномами, что может способствовать генерации транскрипционно активных больших экспрессионных трансгенных кассет.

Двойной AAV OV подход, по-видимому, является особенно интересным при сравнении с TS или гибридным АК подходами, так как двойные AAV OV векторы содержат только последовательности, принадлежащие терапевтической экспрессионной трансгенной кассете. Однако, когда авторы изобретения вводили двойные AAV OV векторы в субретинальное пространство взрослых мышей и свиней, была детектируема только для экспрессии большого белка ABCA4, когда использовали убиквитарные или RPE-специфичные промоторы, но не PR-специфичные промоторы. Это может предположить, что гомо-

логичная рекомбинация, необходимая для двойного AAV OV восстановления является более эффективной в RPE, чем в PR. Это соотносится с низкими уровнями гомологичной рекомбинации, сообщаемыми для постмитотических нейронов (50) и может отчасти объяснить недостаток опосредованной двойными AAV OV MYO7A трансдукцией, недавно сообщаемой для других групп (30). Авторы изобретения делают вывод, что субретинальное введение двойных AAV OV векторов не должно быть использовано для переноса больших генов в PR, хотя авторы изобретения не могут исключать, что последовательности, которые являются более рекомбиногенными, чем включаемые в двойные AAV OV ABCA4 и MYO7A векторы авторов изобретения, могут позволять эффективную гомологичную рекомбинацию в PR.

Двойной AAV TS и гибридный АК подходы эффективно трансдуцируют мышинные и свиные PR, что отличалось от того, что авторы изобретения наблюдали с двойными AAV OV. Это соотносится со знанием того, что механизм реконструкции большого гена, опосредованный двойным AAV TS и гибридным АК подходами, может быть осуществлен посредством ITR-опосредованного присоединения голова к хвосту (32, 35, 51) с большей вероятностью, чем гомологичная рекомбинация.

Уровни мышинной PR трансдукции, которые авторы изобретения достигали с двойным AAV TS и гибридным АК, являются более низкими и менее сопоставимыми, чем с одиночными NS векторами. Однако двойные AAV могут быть эффективны для лечения наследственных ослепляющих состояний, для которых требуется относительно низкие уровни экспрессии трансгена, т.е. заболеваний, наследуемых как аутосомно-рецессивные. В действительности, авторы изобретения демонстрируют, что субретинальная доставка двойных AAV TS и гибридных АК улучшает и даже нормализует сетчаточные дефекты из двух животных моделей наследственного сетчаточных заболеваний, STGD и USH1B, которые обусловлены мутациями в больших генах и являются привлекательными мишенями генной терапии.

Размер генома двойных векторов AAV является гомогенным, что означает, что факторы идентичности и безопасности, относящиеся к их использованию, должны быть менее значительными, чем относящиеся к AAV OZ векторам, которые имеют гетерогенные размеры генома. В отличие от этого авторы изобретения не детектировали ни ERG, ни сетчаточные гистологические аномальности у мышей, за которыми авторы изобретения следили вплоть до 1-2 месяцев после доставки двойного вектора AAV (данные не приведены).

В заключение, авторы изобретения идентифицировали новую рекомбиногенную последовательность (АК), которая удивительным образом улучшает эффективность AAV двойной гибридной векторной системы. В действительности обнаружили, что двойные AAV векторы эффективны как *in vitro*, так и в сетчатке *in vivo*. Тогда как двойные AAV OV векторы эффективно трансдуцируют RPE, они не трансдуцируют PR, тогда как двойные AAV TS и гибридные АК подходы направляют эффективную реконструкцию большого гена в обоих клеточных типах. Подходы с введением двойных AAV TS и гибридных АК улучшали сетчаточный фенотип мышинных моделей STGD и USH1B, что обеспечивает обоснование эффективности этих стратегий для генной терапии для этих и других ослепляющих состояний, которые требуют перенос больших генов в сетчаточные PR, а также RPE. Эти обнаружения значительно расширяют применение векторов AAV для генной терапии не только по отношению к глазам, но также к мышцам, а также другим органам и тканям. Заболевания, отличные от IRD, вызванные дефектными генами, больше чем 5 т.н., включают в себя неограничивающие примеры мышечных дистрофий, недостатки дисферлина (тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2B и миопатия Миоши), кистозный фиброз, гемофилию.

Источники

1. M. M. Sochacki, et al. *Hum. Mutat.* 17, 42-51 (2001).
2. T. Dryja, in *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases* C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, Eds. (McGraw- Hill, New York, NY, 2001), vol 4, pp. 5903-5933.
3. P. Colella, et al. *Trends Mol. Med.* 15, 23-31 (2009).

4. L. H. Vandenberghe, A. Auricchio, *Gene Ther.* 19, 162-168 (2012).
5. J. W. Bainbridge, et al. *N. Engl. J. Med.* 358, 2231-2239 (2008).
6. A. V. Cideciyan, et al. *N. Engl. J. Med.* 361, 725- 727 (2009).
7. A. M. Maguire, et al. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240-2248 (2008).
8. A. M. Maguire, et al. *Lancet* 374, 1597-1605 (2009).
9. F. Simonelli, et al. *Mol. Ther.* 18, 643- 650 (2010).
10. M. Allocca, et al. *J. Virol.* 81, 11372-11380 (2007).
11. C. Mussolino, et al. *Gene Ther.* 18, 637-645 (2011).
12. L. H. Vandenberghe, et al. *Sci. Transl. Med.* 3, 88ra54 (2011).
13. A. Auricchio, *Hum. Gene Ther.* 22, 1169-1170 (2011).
14. M. Natkunarajah, et al. *Gene Ther.* 15, 463-467 (2008).
15. B. Dong, et al. *Mol. Ther.* 18, 87-92 (2010).
16. Y. Lai, et al. *Mol. Ther.* 18, 75- 79 (2010).
17. Z. Wu, et al. *Mol. Ther.* 18, 80-86 (2010).
18. Y. Wang, et al. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 225-233 (2012).
19. P. L. Hermonat, et al. *FEBS Lett.* 407, 78- 84 (1997).
20. R. Allikmets, *Nat. Genet.* 17, 122 (1997).
21. J. M. Millan, et al. *J. Ophthalmol.* 2011, 417217 (2011).
22. T. Hasson, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 9815- 9819 (1995).
23. X. Liu, et al. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 37, 240-252 (1997).
24. D. Gibbs, et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1130-1135 (2010).
25. J. C. Grieger, et al. *J. Virol.* 79, 9933- 9944 (2005).
26. J. Wu, et al. *Hum. Gene Ther.* 18, 171-182 (2007).
27. M. Allocca, et al. *J. Clin. Invest.* 118, 1955-1964 (2008).
28. P. E. Monahan, et al. *Mol. Ther.* 18, 1907-1916 (2010).

29. W. E. Grose, et al. *PLoS One* 7, e39233 (2012).
30. V. S. Lopes, et al. *Gene Ther.* (2013).
31. M. L. Hirsch, et al. *Mol. Ther.* 18, 6-8 (2010).
32. D. Duan, et al. *J. Virol.* 72, 8568- 8577 (1998).
33. Z. Yan, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 6716-6721 (2000).
34. D. Duan, et al. *Mol. Ther.* 4, 383-391 (2001).
35. A. Ghosh, et al. *Mol. Ther.* 16, 124-130 (2008).
36. Y. Lai, et al. *Nat. Biotechnol.* 23, 1435-1439 (2005).
37. S. J. Reich, et al. *Hum. Gene. Ther.* 14, 37-44 (2003).
38. A. Ghosh, et al. *J. Gene Med.* 8, 298-305 (2006).
39. A. Ghosh, et al. *Hum. Gene Ther.* 22, 77-83 (2011).
40. X. Dong, et al. *PLoS One* 5, e13479 (2010).
41. N. Esumi, et al. *J. Biol. Chem.* 279, 19064-19073 (2004).
42. L. Wu, et al. *Adv. Exp. Med. Biol.* 664, 533-539 (2010).
43. M. Illing, et al. *J. Biol. Chem.* 272, 10303-10310 (1997).
44. H. Sun, et al. *Nat. Genet.* 17, 15-16 (1997).
45. N. L. Mata, et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1685-1690 (2001).
46. C. Lillo, et al. *Adv. Exp. Med. Biol.* 533, 143-150 (2003).
47. X. Liu, et al. *Nat. Genet.* 19, 117-118 (1998).
48. X. Liu, et al. *J. Neurosci.* 19, 6267-6274 (1999).
49. S. G. Jacobson, et al. *Mol. Ther.* 13, 1074-1084 (2006).
50. M. L. Fishel, et al. *Mutat. Res.* 614, 24-36 (2007).
51. Z. Yan, et al. *J. Virol.* 79, 364-379 (2005).
52. G. Gao, et al. *Hum. Gene Ther.* 11, 2079-2091 (2000).
53. A. Auricchio, et al. *Hum. Gene Ther.* 12, 71-76 (2001).
54. C. Mueller, et al. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 14, Unit14D 11 (2012).
55. L. Drittanti, et al. *Gene Ther.* 7, 924-929 (2000).
56. Y. Zhang, et al. *J. Virol.* 74, 8003- 8010 (2000).
57. R. A. Radu, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 5928-5933 (2004).
58. V. E. Papaioannou, J. G. Fox, *Lab. Anim. Sci.* 43, 189-192 (1993).
59. F. Q. Liang, et al. in *Methods in Molecular Medicine: Vision Research Protocols*, P.E. Rakoczy, Ed. (Humana Press Inc, Totowa, NJ., 2000), vol. 47, pp. 125-139.
60. A. Gargiulo, et al. *Mol. Ther.* 17, 1347-1354 (2009).
61. V. N. Venables, B. D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S*, S. J. Chambers, W. Eddy, W. Hardle, Sheater S, L. Tierney, Eds., (Springer Science+Business Media, New York, USA, 2002).[fourth edition].
62. Weng, J., et al. *I Cell* 98,13-23 (1999).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система двойного конструктора для экспрессирования кодирующей последовательности гена, представляющего интерес, в клетке-хозяина, при этом указанная кодирующая последовательность состоит из участка 5'-конца и участка 3'-конца, при этом указанная система двойного конструктора содержит:

а) первую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность AAV 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность промотора;

участок 5' конца указанной кодирующей последовательности, при этом указанный участок 5'-конца функционально связан с и находится под контролем указанного промотора;

последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга; и

последовательность AAV 3'-инвертированного терминального повтора (3'-ITR); и

б) вторую плазмиду, содержащую в 5'-3' направлении:

последовательность AAV 5'-инвертированного терминального повтора (5'-ITR);

последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга;

3'-конец указанной кодирующей последовательности;

последовательность нуклеиновой кислоты сигнала полиаденилирования; и

последовательность AAV 3'-инвертированного терминального повтора (3'-ITR),

где указанная первая плазида дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты рекомбиногенной области в 5' положении 3'ITR AAV указанной первой плазмиды и в 3' положении последовательности нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга и где указанная вторая плазида дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты рекомбиногенной области в 3' положении 5'-ITR AAV указанной второй плазмиды и в 5' положении последовательности нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга, где рекомбиногенная область является рекомбиногенной областью фага F1, которая состоит из последовательности

GGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA AAAAATTTAACGCG AATTTTAACA AAAAAT (SEQ ID NO. 3) или ее фрагмента, который сохраняет рекомбиногенное свойство SEQ ID No. 3, где при введении указанной первой плазмиды и указанной второй плазмиды в клетку-хозяина указанная кодирующая последовательность воссоздается посредством донорного сигнала сплайсинга и акцепторного сигнала сплайсинга,

где указанный ген, представляющий интерес, является геном, подходящим для лечения и/или профилактики патологии или заболевания, характеризующихся дегенерацией сетчатки.

2. Система двойного конструктора по п.1, в которой нуклеотидная последовательность ITR происходит из того же серотипа AAV или из разных серотипов AAV.

3. Система двойного конструктора по любому из пп.1, 2, в которой 3'-ITR первой плазмиды и 5'-ITR второй плазмиды происходят из одинакового серотипа AAV.

4. Система двойного конструктора по любому из пп.1-3, в которой 5'-ITR и 3'-ITR первой плазмиды и 5'-ITR и 3'-ITR второй плазмиды происходят соответственно из разных серотипов AAV.

5. Система двойного конструктора по любому из пп.1-4, в которой 5'-ITR первой плазмиды и 3'-ITR второй плазмиды происходят из разных серотипов AAV.

6. Система двойного конструктора по любому из пп.1-5, в которой последовательность нуклеиновой кислоты донорного сигнала сплайсинга состоит из последовательности GTAAGTATCAAGGTTAC AAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT (SEQ ID No. 1) и/или в которой последовательность нуклеиновой кислоты акцепторного сигнала сплайсинга состоит из последовательности GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCT CTCACAG (SEQ ID No. 2).

7. Система двойного конструктора по любому из пп.1-6, в которой кодирующая последовательность является нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, способный корректировать наследственную дегенерацию сетчатки.

8. Система двойного конструктора по п.7, в которой кодирующая последовательность выбрана из группы, состоящей из ABCA4, MYO7A, CEP290, CDH23, EYS, USH2a, GPR98 или ALMS1.

9. Двойная вирусная векторная система для экспрессирования кодирующей последовательности гена, представляющего интерес, в клетке-хозяина, содержащая систему двойного конструктора по пп.1-8, где первый вирусный вектор содержит первую плазмиду системы двойного конструктора по пп.1-8 и второй вирусный вектор содержит вторую плазмиду системы двойного конструктора по пп.1-8.

10. Двойная вирусная векторная система по п.9, в которой векторы являются аденоассоциированными вирусными (AAV) векторами.

11. Двойная вирусная векторная система по п.9, в которой аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы выбраны из одинаковых или различных серотипов AAV.

12. Двойная вирусная векторная система по п.9, в которой аденоассоциированный вирус выбран из серотипа 2, серотипа 8, серотипа 5, серотипа 7 или серотипа 9.

13. Клетка-хозяина для экспрессирования кодирующей последовательности гена, представляющего

интерес, содержащая двойную вирусную векторную систему в соответствии с любым из пп.9-12.

14. Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики патологии или заболевания, характеризуемых дегенерацией сетчатки, содержащая систему двойного конструкта по пп.1-8, двойную вирусную векторную систему в соответствии с любым из пп.9-12 или клетку-хозяина по п.13 и фармацевтически приемлемый носитель.

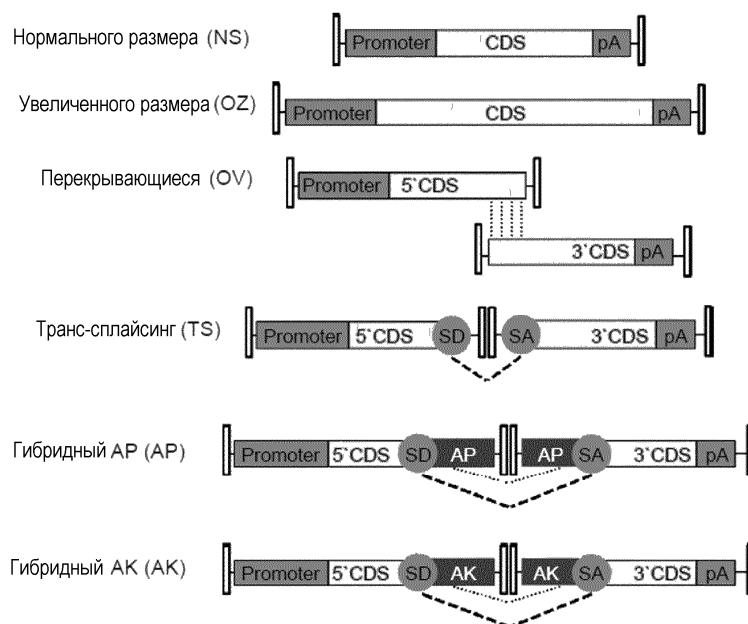
15. Способ лечения и/или профилактики патологии или заболевания, характеризуемых дегенерацией сетчатки, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества системы двойного конструкта по пп.1-8, двойной вирусной векторной системы в соответствии с любым из пп.9-12, клетки-хозяина по п.13 или фармацевтической композиции по п.14.

16. Способ по п.15, где сетчаточная дегенерация является наследственной.

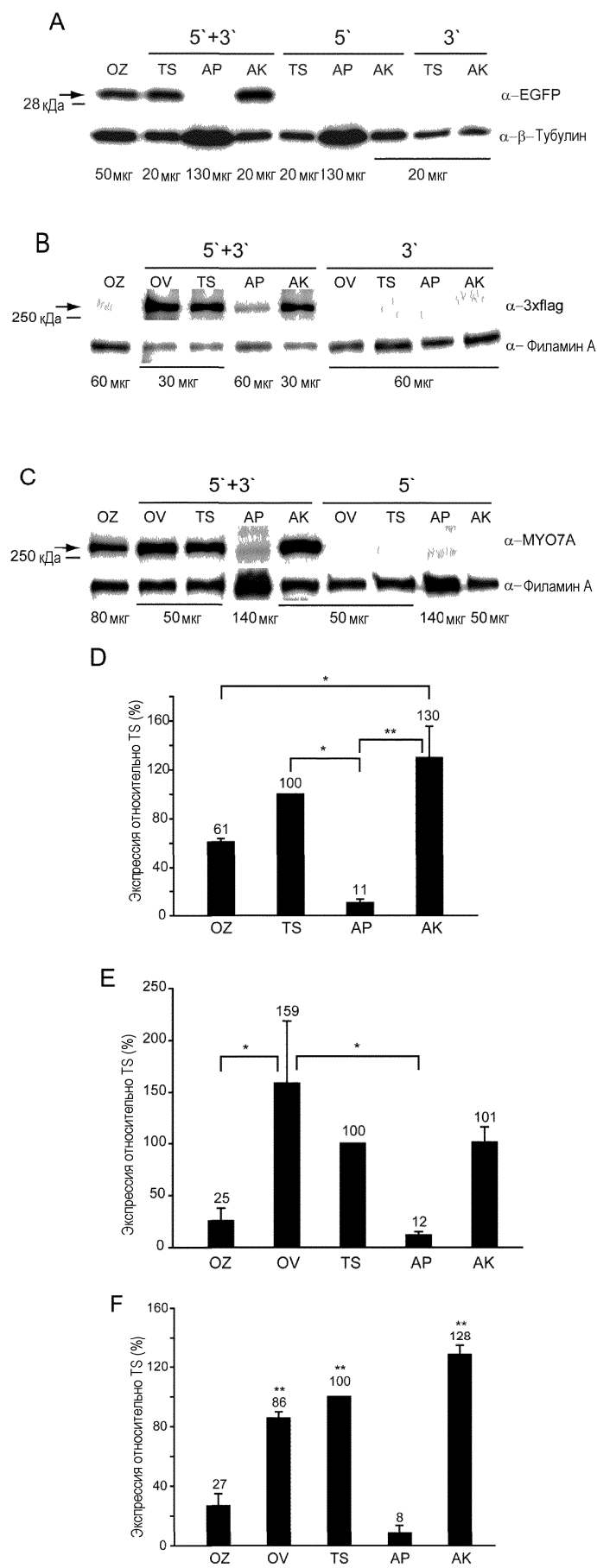
17. Способ по п.15, где патология или заболевание выбраны из группы, состоящей из пигментного ретинита, Амавроза Лебера (LCA), Болезни Штаргардта, заболевания Ушера, синдрома Альстрема, заболевания, вызванного мутацией в гене ABCA4.

18. Нуклеиновая кислота, состоящая из SEQ ID No. 3 или ее фрагмент, который сохраняет рекомбиногенное свойство SEQ ID No. 3, являющаяся рекомбиногенной областью.

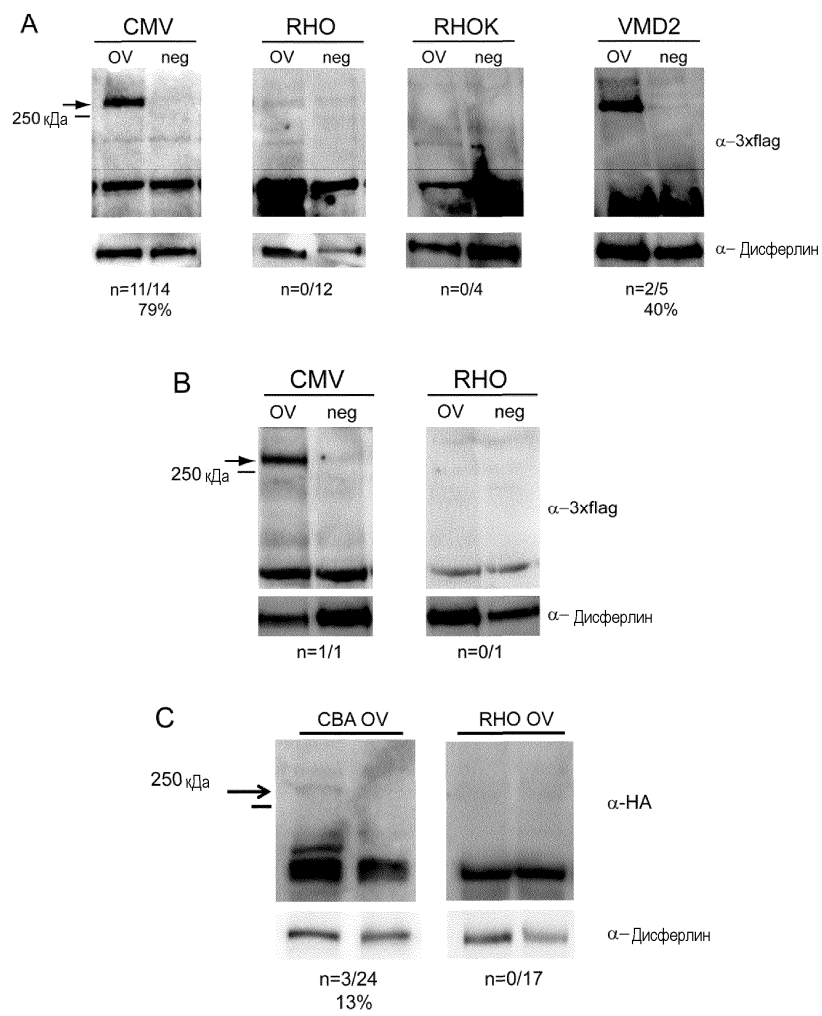
19. Способ для индуцирования генетической рекомбинации, содержащий использование последовательности, состоящей из SEQ ID No. 3, или ее фрагмента, который сохраняет рекомбиногенное свойство SEQ ID No. 3.



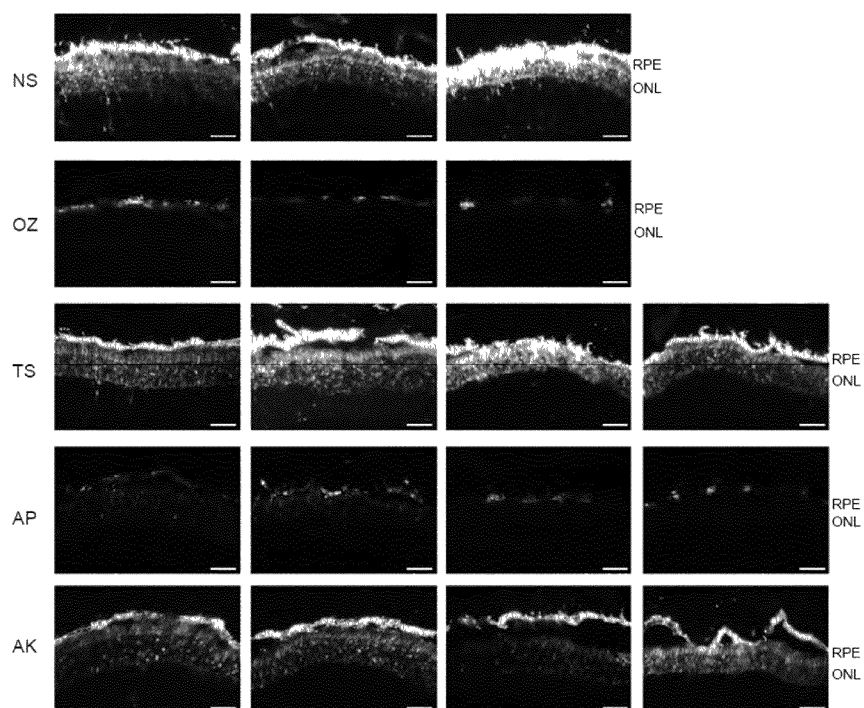
Фиг. 1



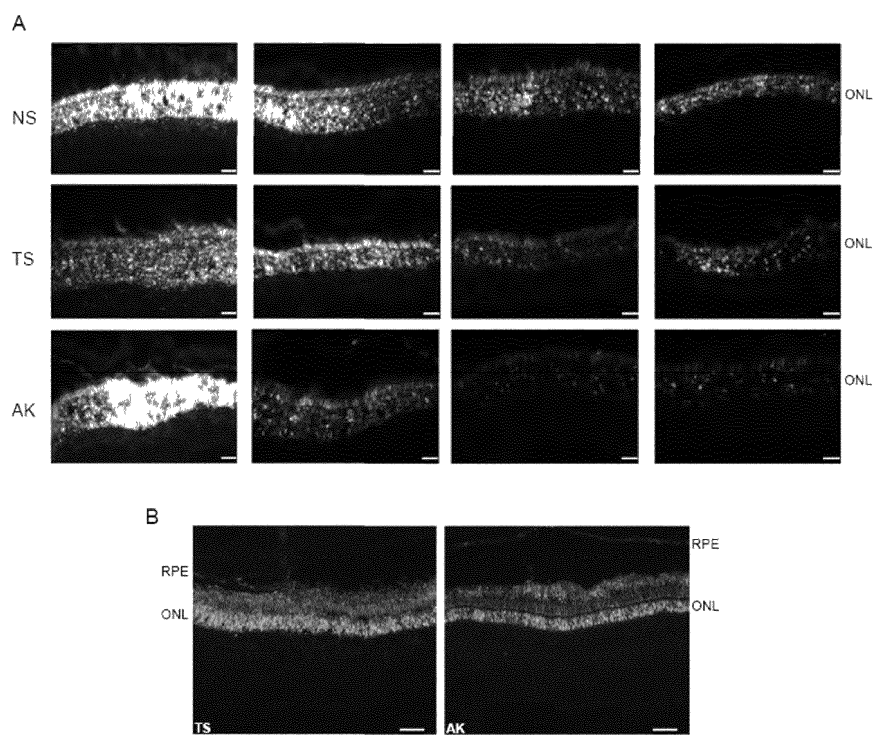
Фиг. 2



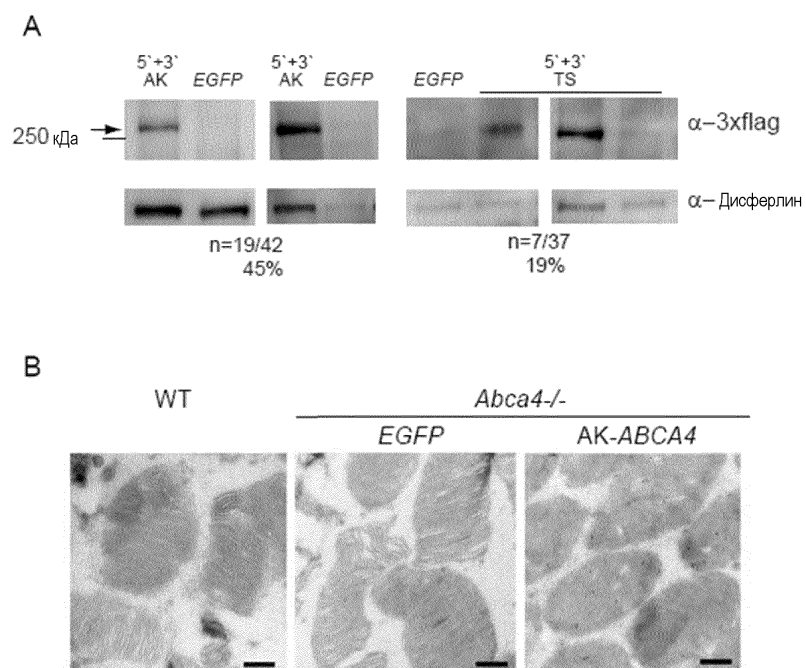
Фиг. 3



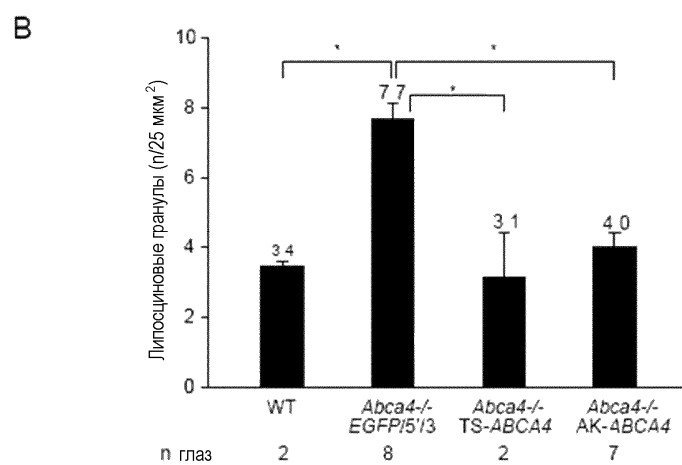
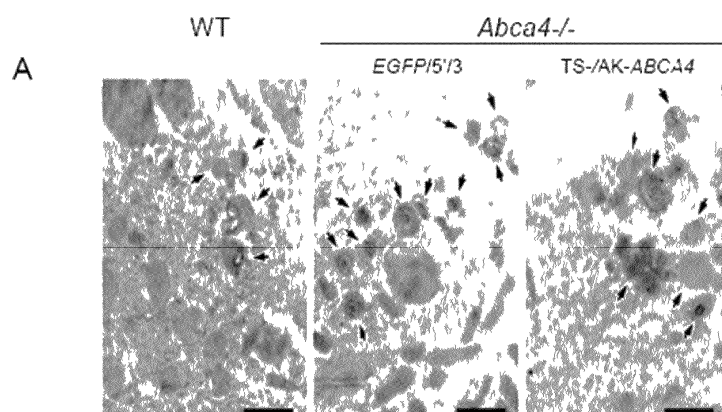
Фиг. 4



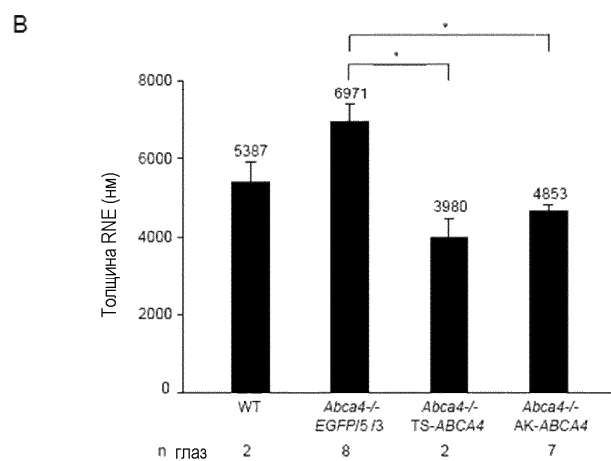
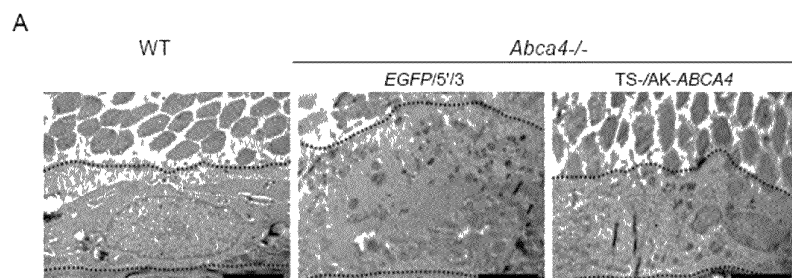
Фиг. 5



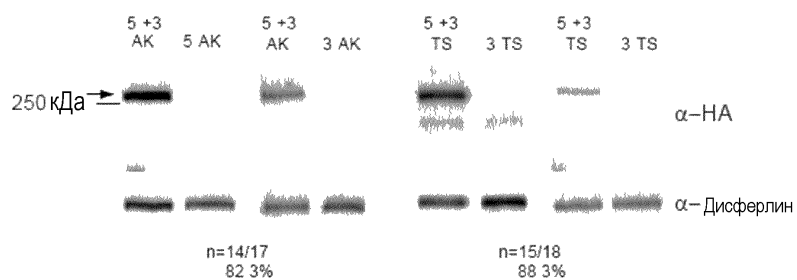
Фиг. 6



Фиг. 7

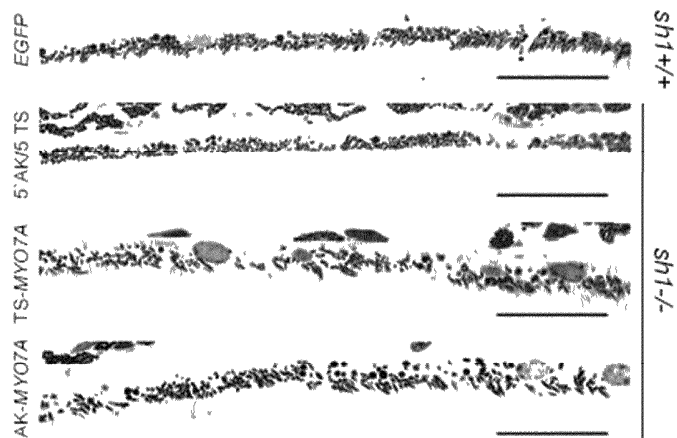


Фиг. 8

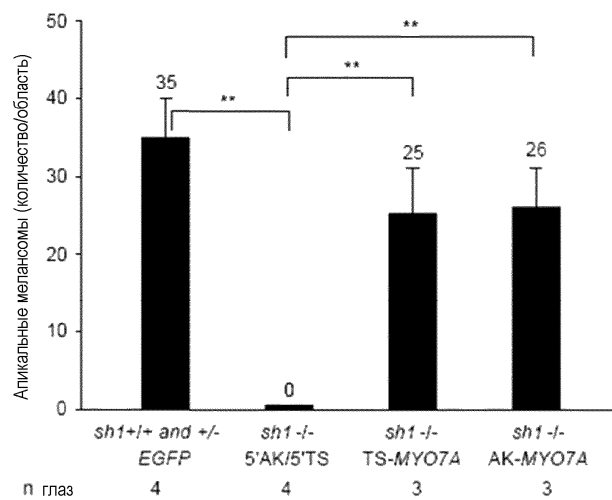


Фиг. 9

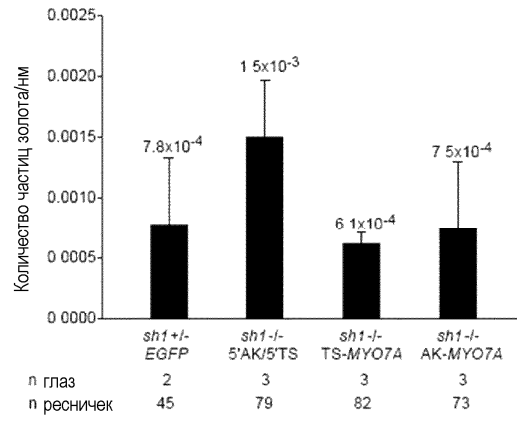
А



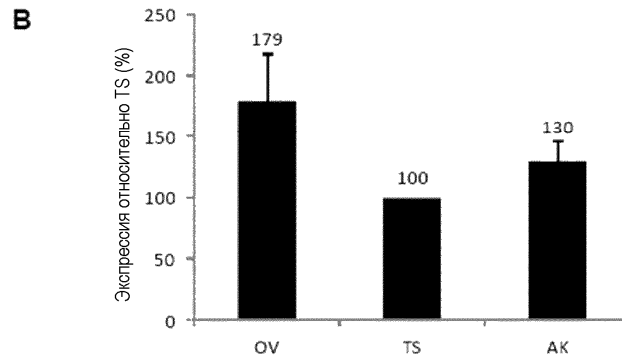
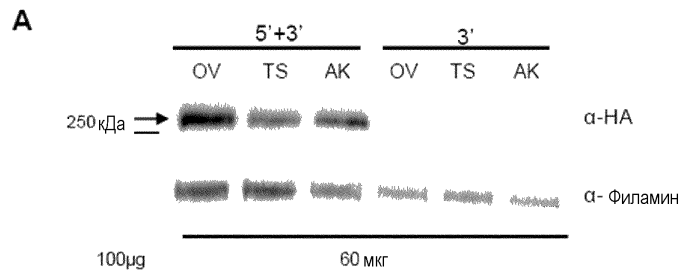
В



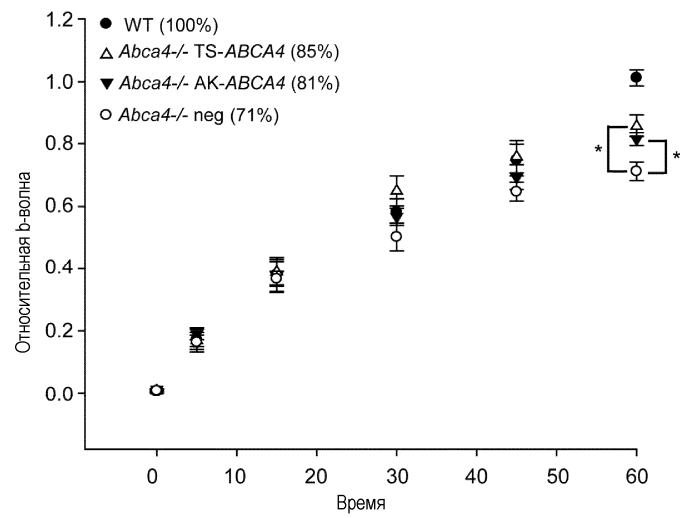
Фиг. 10

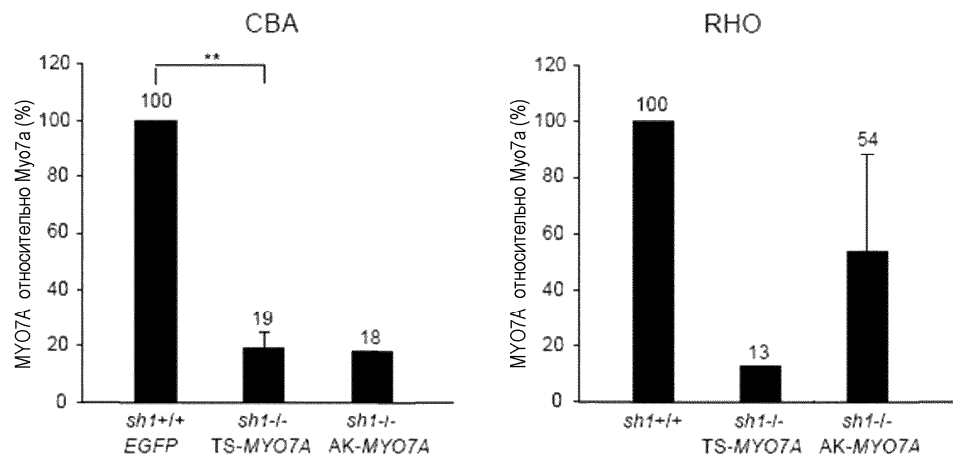


11

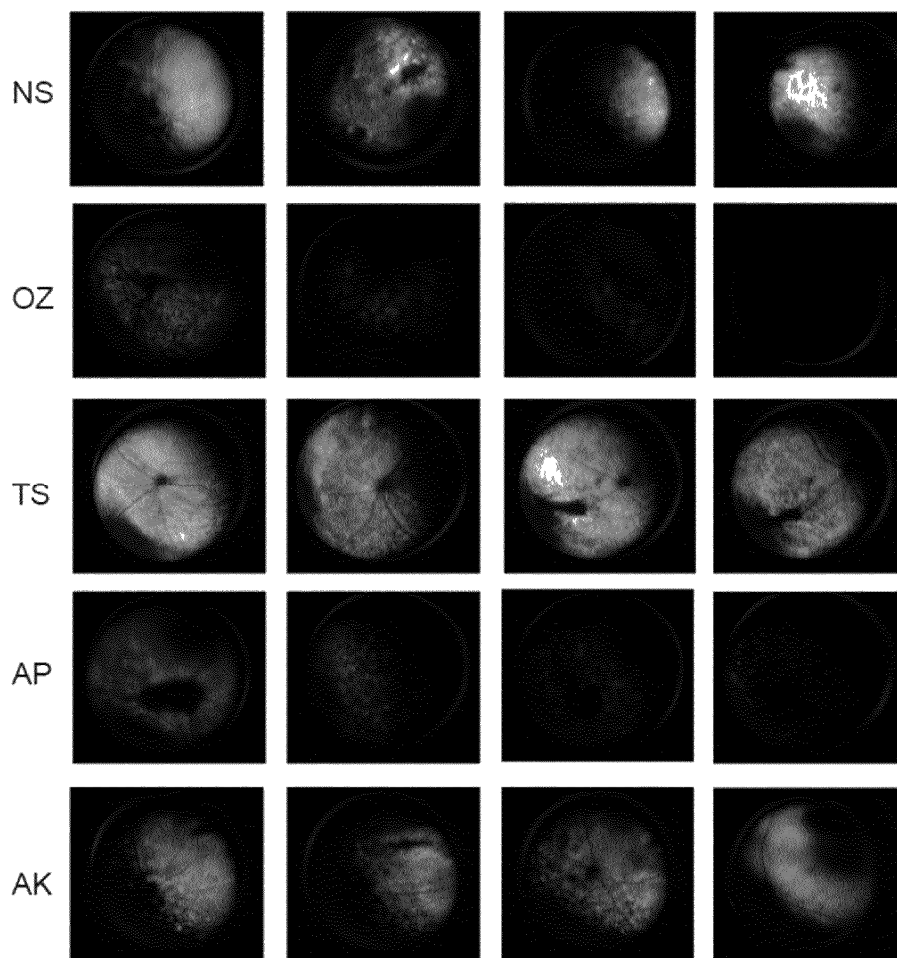


Фиг. 11, 12

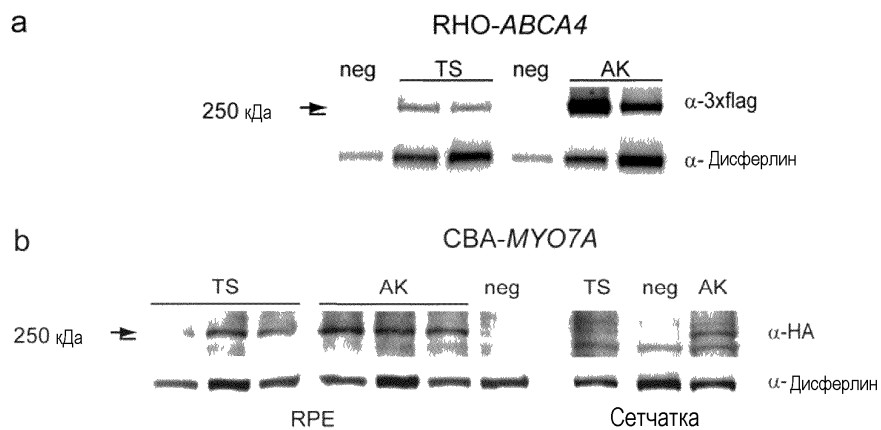




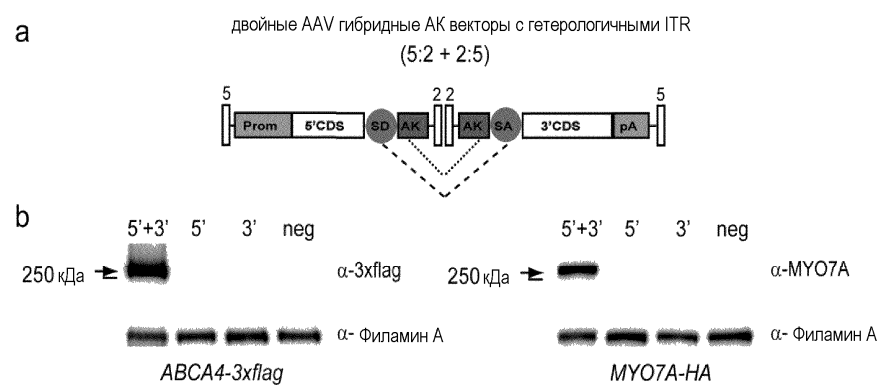
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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