



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.08.27**

**(51)** Int. Cl. **C12N 9/88** (2006.01)  
**C12N 15/864** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201291103**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.04.22**

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУСНЫЙ ВЕКТОР (rAAV), КОДИРУЮЩИЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНУЮ, СПЕЦИФИЧНУЮ В ОТНОШЕНИИ СЕТЧАТКИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗУ ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБНЫЙ ПРЕДОХРАНЯТЬ ИЛИ ВОССТАНАВЛИВАТЬ ОПОСРЕДОВАННУЮ КОЛБОЧКАМИ ФУНКЦИЮ ГЛАЗА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

**(31)** **61/327,521**

**(32)** **2010.04.23**

**(33)** **US**

**(43)** **2013.10.30**

**(86)** **PCT/US2011/033669**

**(87)** **WO 2011/133933 2011.10.27**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА  
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:

**Бойе Шэннон Элизабет, Хаузвирт  
Уилльям У., Бойе Сэнфорд Леон (US)**

**(74)** Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** **WO-A2-02082904**

HAIRE SHANNON E. ET AL.: "Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC1", PubMed Central (PMC) Author Manuscript INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, September 2006 (2006-09), pages 1-18, XP002661104, ISSN: 0146-0404, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1761699/pdf/nihms14686.pdf> [retrieved on 2011-10-18], cited in the application, abstract, page 2, page 3, page 9

BOYE S.E. ET AL.: "Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, UNITED STATES, vol. 5, no. 6, 25 June 2010 (2010-06-25), pages E11306-1, XP002642412, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0011306, cited in the application, the whole document

KONG FANSHENG ET AL.: "Self-complementary AAV5 vector facilitates quicker transgene expression in photoreceptor and retinal pigment epithelial cells of normal mouse", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, vol. 90, no. 5, 4 February 2010 (2010-02-04), pages 546-554, XP002661105, ISSN: 1096-0007, abstract

PANG J. ET AL.: "Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency", GENE THERAPY, vol. 17, no. 7, 18 March 2010 (2010-03-18), pages 815-826, XP002661106, ISSN: 1476-5462, cited in the application, abstract

DATABASE UniProt [Online], 1 July 1993 (1993-07-01), "RecName: Full=Retinal guanylyl cyclase 1; Short=RETGC-1; EC=4.6.1.2; AltName: Full=Guanylate cyclase 2D, retinal; AltName: Full=Rod outer segment membrane guanylate cyclase; Short=ROS-GC; Flags: Precursor", XP002661107, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q02846, Database accession no. Q02846, sequence

DATABASE UniProt [Online], 1 October 1996 (1996-10-01), "RecName: Full=Guanylyl cyclase GC-E; EC=4.6.1.2; AltName: Full=Guanylate cyclase 2E; Flags: Precursor", XP002661108, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P52785, Database accession no. P52785, sequence

**(57)** Изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусному вектору (rAAV), кодирующему биологически активную, специфичную в отношении сетчатки гуанилатциклазу человека, который способен предохранять или восстанавливать опосредованную колбочками функцию глаза млекопитающего. Также изобретение относится к соответствующей композиции, содержащей заявленный вектор rAAV. Заявленный вектор и композиция используются в способе предотвращения, лечения или облегчения заболевания, расстройства, дисфункции или аномального состояния глаза млекопитающего; в способе повышения уровня биологически активной, специфичной в отношении сетчатки гуанилатциклазы в клетках сетчатки млекопитающего; в способе лечения или облегчения симптомов дистрофии сетчатки у млекопитающего. В частном случае изобретение направлено против врожденного амавроза Лебера типа 1 у млекопитающего.

## **Основы создания изобретения**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

В настоящем изобретении заявлен приоритет в соответствии с предварительной патентной заявкой Соединенных Штатов Америки № 61/327521, поданной 23 апреля 2010 г., проходящей в настоящее время экспертизу, полное содержание которой умышленно включено в настоящее описание в виде ссылки.

### **Сведения относительно федерального спонсирования исследования**

Правительство Соединенных Штатов имеет определенные права на настоящее изобретение в соответствии с грантами под номерами EY 13729, EY11123 и EY08571 из Национальных Институтов Здоровья (NIH).

### **Наименования сторон по поводу соглашения в связи с совместными исследованиями**

Не применимо к данному случаю.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение в целом связано с областями молекулярной биологии и вирусологии и, в частности, со способами применения композиций рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), которые экспрессируют по меньшей мере первый сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере первый терапевтический продукт гена, и, в частности, те продукты, которые применимы для профилактики, лечения или облегчения одного или нескольких симптомов заболеваний, расстройств, травм, повреждений или дисфункций глаза млекопитающего. В конкретных воплощениях в настоящем изобретении предложены композиции, включая векторы rAAV, которые экспрессируют биологически функциональный гуанилатциклязный пептид, полипептид или белок для его использования в одной или нескольких диагностических и/или терапевтических схемах лечения, включая, например, лечение одного или нескольких расстройств или заболеваний глаз млекопитающего и, в частности, для лечения наследственной сетчаточной слепоты, включая дистрофию сетчатки, такую как врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1), у человека. Предложены также способы получения лекарственных средств на основе гуанилатциклязного вектора rAAV для применения в генной терапии на основе вирусного вектора, включая, например, векторы rAAV-LCA1 для лечения или облегчения одного или нескольких симптомов гуанилатциклязного дефицита у человека.

### **Описание предшествующего уровня техники**

Врожденный амавроз Лебера (LCA) (раньше назывался "наследственным амаврозом Лебера"), впервые описанный немецким офтальмологом доктором Теодором Лебером в 1869 г. как пигментная дистрофия сетчатки наследственного типа (или пигментный ретинит, RP), является наиболее ранней и самой тяжелой формой наследственной ретинопатии и насчитывает приблизительно 6% из всех наследуемых дистрофий сетчатки. LCA входит в группу дегенеративных заболеваний сетчатки и является наиболее частой причиной наследственной слепоты у детей. Данное аутосомно-рецессивное состояние обычно распознается при рождении или в течение первых месяцев жизни ребенка с полной слепотой или существенно нарушенным зрением, нормальным глазным дном и резко уменьшенной по амплитуде электроретинограммой (ERG) (см., например, Perrault et al., 1996). Несмотря на указанные функциональные дефициты, пациенты с LCA1 на годы сохраняют некоторое количество зрительных рецепторов палочек и колбочек сетчатки как в своей макулярной, так и в периферической зоне сетчатки. Симптомы данного заболевания включают в себя дисфункцию сетчатки, неустойчивые движения глазных яблок (нистагм), ослабленное зрение, слабую реакцию зрачка и в конечном итоге слепоту.

Посредством генетического анализа было показано, что мутации в гене гуанилатциклазы-1 (*Gucy2d*), относящиеся к локусу LCA1, являются причиной 20% всех опубликованных случаев LCA (см., например, Milam et al., 2003; Perrault et al., 1996; Perrault et al., 2000). Число пациентов, пораженных LCA1, приблизительно вдвое больше количества пациентов, страдающих версией данного заболевания (LCA2), связанной с наличием дефектов в белке (RPE65) в 65-кДа, специфичном для пигментного эпителия сетчатки, который в последнее время привлекает большое внимание специалистов в области генной терапии.

Согласно оценкам, 200000 американцев поражены наследственным амаврозом Лебера типа 1. Ген *Gucy2d* кодирует гуанилатциклазу (*retGC1*), которая экспрессируется в зрительных рецепторах мембран внешнего сегмента (см., например, Dizhoor et al., 1994; Liu et al., 1994) и играет роль в восстановительной фазе фотопреобразования. Считается, что мутации, которые уменьшают или аннулируют активность указанного фермента, создают биохимический эквивалент хронического оптического экспонирования палочковидных и колбочковидных зрительных фоторецепторов. LCA обычно рассматривается как следствие либо аномалии развития зрительных рецепторов (фоторецепторов), либо исключительно ранней дегенерации клеток, развитие которых прошло нормально. Локус (*GUCY2D*) LCA1 картирован на человеческой хромосоме 17p13.1 (LCA1) путем гомозиготного картирования.

### **Отсутствие предшествующего уровня техники**

В настоящее время не существует эффективной профилактики или терапии, доступной для предотвращения или лечения LCA1 у человека.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении преодолены ограничения, имевшие место в предшествующем уровне техники, и предложены новые, неочевидные и полезные конструкции на основе gAAV, которые кодируют один или несколько терапевтических полипептидов млекопитающих, и, в частности, такие белки, пептиды, полипептиды гуанилатциклазного семейства, которые позволяют осуществлять профилактику, лечение и/или облегчение одного или нескольких заболеваний, расстройств или дисфункций у млекопитающих или же одного или нескольких их симптомов, которые обусловлены или отягощены нехваткой или отсутствием активности биологически активного полипептида гуанилатциклазы.

В частности, в настоящем изобретении предложены генетические конструкции, кодирующие один или несколько специфичных для сетчатки млекопитающих полипептидов гуанилатциклазы (retGC1), для применения при лечении таких состояний, как LCA1, а также других глазных расстройств, таких как рессивная и доминантная формы палочко-колбочковой дистрофии, которая появляется в результате дефицита или отсутствия физиологически нормальных уровней гуанилатциклазного полипептида.

В одном из воплощений в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор (gAAV), включающий в себя по меньшей мере первый полинуклеотид, который содержит промотор, оперативно связанный по меньшей мере с первым сегментом нуклеиновой кислоты, который кодирует по меньшей мере первый гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид. Предпочтительно, чтобы указанный промотор был фоторецептор-специфическим промотором (таким, например, как промотор человеческой родопсинкиназы) или убиквитарным промотором (таким, например, как промотор укороченного химерного CMV-куриного  $\beta$ -актина). Предпочтительно, чтобы указанный первый сегмент нуклеиновой кислоты кодировал по меньшей мере первый гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид млекопитающих, который включает в себя, по существу состоит или, альтернативно, состоит по меньшей мере из первой непрерывной области аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 85% или приблизительно на 90% или более идентична по меньшей мере первой области последовательности, состоящей по меньшей мере приблизительно из 60, приблизительно из 70, приблизительно из 80, приблизительно из 90 или приблизительно из 100 или более смежных аминокислот последовательности, представленной в любой какой-нибудь одной или нескольких последовательностях гуанилатциклазных белков млекопитающих, приведенных в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В определенных воплощениях указанный по меньшей мере первый сегмент нуклеиновой кислоты предпочтительно кодирует по меньшей мере первый гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид млекопитающих, который включает в себя по меньшей мере первую непрерывную область аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94% или приблизительно на 95% или более идентична по аминокислотной последовательности по меньшей мере первой области последовательности, состоящей по меньшей мере приблизительно из 100, приблизительно из 110, приблизительно из 120, приблизительно из 130, приблизительно из 140 или приблизительно из 150 или более смежных аминокислот последовательности, представленной в любой какой-нибудь одной или нескольких последовательностях гуанилатциклазных белков млекопитающих, приведенных в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

Предпочтительно, чтобы по меньшей мере первый сегмент нуклеиновой кислоты кодировал по меньшей мере один или несколько гуанилатциклазных белков, пептидов или полипептидов млекопитающих, каждый из которых предпочтительно включал бы в себя по меньшей мере первую непрерывную первичную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% идентична по меньшей мере первой области последовательности, которая включает в себя по меньшей мере приблизительно 90, приблизительно 110, приблизительно 130, приблизительно 150 или приблизительно 170 или более смежных аминокислот по меньшей мере первого гуанилатциклазного белка, как показано в любой какой-нибудь одной или нескольких последовательностях гуанилатциклазных белков млекопитающих, приведенных в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

Предпочтительно, чтобы векторы gAAV согласно настоящему изобретению включали бы в себя по меньшей мере первый сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий по меньшей мере первый гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид, который включает в себя, по существу состоит или, альтернативно, состоит по меньшей мере из аминокислотной последовательности какой-нибудь одной или нескольких из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, или полинуклеотидную последовательность, которая была бы комплементарна или специфически гибридизовалась бы с одной какой-нибудь или несколькими такими последовательностями в

условиях, от жестких до очень жестких условий гибридизации. Предпочтительно, чтобы указанный первый гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид млекопитающих обладал гуанилатциклазной активностью *in vitro* и *in vivo* в трансформированных клетках млекопитающего и предпочтительно в трансформированных клетках-хозяевах человека. В особых аспектах указанные гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид будут проявлять значительную биологически активную гуанилатциклазную активность *in vitro* и *in vivo* в трансформированных клетках млекопитающего и предпочтительно в трансформированных клетках-хозяевах человека, когда указанный сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий указанные пептид, белок или полипептид, оперативно связан по меньшей мере с первым промотором, способным к экспрессии указанной последовательности в клетке-хозяине млекопитающего и предпочтительно человека.

Несмотря на то, что векторы gAAV согласно настоящему изобретению необязательно ограничены конкретным серотипом, в определенных воплощениях авторы настоящего изобретения считают, что благоприятные результаты могут быть достигнуты при использовании вектора gAAV, который относится к одному или нескольким из следующих известных серотипов:

вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 1 (rAAV1),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 2 (rAAV2),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 3 (rAAV3),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 4 (rAAV4),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 5 (rAAV5),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 6 (rAAV6),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 7 (rAAV7),  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 8 (rAAV8) или  
вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 9 (rAAV).

В определенных случаях применения векторы gAAV согласно настоящему изобретению могут быть само-комплементарными векторами gAAV (scAAV).

При тех воплощениях изобретения, при которых желателен фоторецептор-специфический промотор, описанные здесь векторы gAAV могут включать в себя по меньшей мере первый фоторецептор-специфический родопсинкиназный промотор. Примеры таких промоторов включают в себя человеческий родопсинкиназный промотор, который представлен в последовательности SEQ ID NO: 12. В определенных аспектах настоящего изобретения применение промоторной последовательности, которая включает в себя по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45 или по меньшей мере приблизительно 50 или более смежных нуклеотидов из последовательности SEQ ID NO: 12, является особенно предпочтительным, когда требуется тканеспецифическая (и, в частности, фоторецептор-специфическая) экспрессия терапевтической конструкции.

Сходным образом, при таких воплощениях, когда желателен убиквитарный промотор, описанные здесь векторы gAAV могут включать в себя по меньшей мере первый промотор укороченного химерного CMV-куриного  $\beta$ -актина. Примеры таких промоторов включают в себя промотор укороченного химерного CMV-куриного  $\beta$ -актина, который представлен в последовательности SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах настоящего изобретения применение промоторной последовательности, которая включает в себя по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 35, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 45 или по меньшей мере приблизительно 50 или более смежных нуклеотидов из последовательности SEQ ID NO: 13, является особенно предпочтительным, когда требуется тканеспецифическая экспрессия терапевтического гена.

В некоторых воплощениях промоторная последовательность, используемая в описанных конструкциях терапевтического гена, может включать в себя, по существу состоять или, альтернативно, состоять из последовательности нуклеиновой кислоты, которая включает в себя по меньшей мере 55, приблизительно 60, приблизительно 65, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85, приблизительно 90, приблизительно 95, приблизительно 100, приблизительно 105, приблизительно 110, приблизительно 115 или приблизительно 120 или более смежных нуклеотидов из промоторных последовательностей, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

Описанные здесь векторы геновой терапии могут также дополнительно и необязательно включать в себя одну или несколько "вышележащих" или "нижележащих" регуляторных последовательностей, таких как последовательность первого энхансера, оперативно связанная по меньшей мере с первым сегментом нуклеиновой кислоты, или область регуляции транскрипции, такая как посттрансляционный элемент вируса гепатита лесного североамериканского сурка. Конструкции согласно настоящему изобретению могут также дополнительно и необязательно включать в себя одну или несколько интронных последовательностей, оперативно связанных по меньшей мере с первым сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующим терапевтическое средство.

Сегменты нуклеиновой кислоты, кодирующие гуанилатциклазные белки, пептиды и полипептиды млекопитающих согласно настоящему изобретению, могут быть получены из природных, полусинтетических или полностью искусственных последовательностей, однако предпочтительно, чтобы они относились к таковым млекопитающих. Примеры источников последовательностей млекопитающих включают в себя, не ограничиваясь перечисленным, последовательности человека, любых приматов, кроме человека, заячьих, мышинных или крысиных, кошачьих, собачьих, свиных, овечьих, бычьих, лошадиных, козлиных, волчьих и т.д.

Описанные здесь векторы гAAV могут необязательно содержаться внутри инфекционной аденоассоциированной вирусной частицы, вириона или же внутри одной или нескольких из множества инфекционных частиц AAV. Как таковое, настоящее изобретение включает в себя также вирионы, вирусные частицы, а также изолированные клетки-хозяева, которые содержат одну или несколько из описанных здесь генетических конструкций гAAV. Особенно предпочтительные для осуществления настоящего изобретения клетки-хозяева включают в себя, не ограничиваясь перечисленным, изолированные клетки-хозяева млекопитающих, которые включают в себя один или несколько из следующих элементов: вектор гAAV, вирион AAV или множество инфекционных вирусных частиц.

В других аспектах настоящее изобретение относится к новым и полезным композициям, которые включают в себя один или несколько из следующих компонентов: (а) вектора гAAV, вириона гAAV, инфекционных вирусных частиц гAAV, множества таких вирионов или инфекционных частиц, или изолированных клеток-хозяев млекопитающего, которые содержат указанные вектор, вирион, инфекционную частицу или их множество. Предпочтительно, чтобы такие композиции дополнительно и необязательно включали в себя один или несколько фармацевтически приемлемых буферов, носителей, наполнителей, разбавителей и т.п., и могли бы дополнительно и необязательно включать в себя один или несколько липидов, липосом, липидных комплексов, этосом, ниосом, наночастиц, микрочастиц, липосфер, нанокапсул или любую их комбинацию. Предпочтительно, чтобы такие композиции были преимущественно составлены для введения в глаз человеку и могли бы быть использованы в терапии или профилактике, в частности в терапии или профилактике дистрофии, заболевания или расстройства сетчатки (такого как LCA1) у человека.

Как указано ниже, настоящее изобретение включает в себя также диагностические, терапевтические и профилактические наборы, которые включают в себя одну или несколько из описанных здесь конструкций вектора гAAV. Такие наборы могут дополнительно необязательно включать в себя один или несколько протоколов, режимов дозирования или инструкций для применения указанного компонента в диагностике, профилактике, лечении или облегчении одного или нескольких симптомов дистрофии, заболевания, расстройства или аномального состояния сетчатки у человека. В определенных аспектах рассматриваются, в частности, терапевтические наборы для лечения пациентов, у которых диагностирован врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA-1).

Настоящее изобретение относится также к применению одной или нескольких из описанных выше композиций на основе гAAV в терапии или в профилактике заболеваний или расстройств млекопитающего. Сходным образом, настоящее изобретение включает в себя применение описанных композиций в изготовлении лекарственного средства для диагностики, профилактики, лечения или облегчения одного или нескольких симптомов заболевания, расстройства, дисфункции или аномального состояния глаза млекопитающего и, в частности, для лечения или облегчения одного или нескольких симптомов врожденного амавроза Лебера типа 1 (LCA-1) у человека.

Настоящее изобретение относится также к способу предотвращения, лечения или облегчения одного или нескольких симптомов заболевания, дисфункции, расстройства, дефицита или аномального состояния у млекопитающего. Такой способ обычно включает в себя введение млекопитающему, в случае необходимости, эффективного количества описанной здесь композиции гAAV в течение периода, достаточного для предотвращения, лечения и/или облегчения одного или нескольких симптомов заболевания, дисфункции, расстройства, дефицита или аномального состояния у млекопитающего. У такого млекопитающего предпочтительно либо имеется, либо предполагается наличие, либо есть определенный риск развития, либо диагностировано по меньшей мере первое расстройство, заболевание или дистрофия сетчатки, включая, например, врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA-1), или же такое млекопитающее имеет определенный риск развития или у него диагностированы один или несколько дефицитов, дефектов или отсутствие биологически активного, функционального белка, пептида или полипептида гуанилатциклазы. Млекопитающее может быть любого возраста, однако более предпочтительно, чтобы оно было новорожденным, в неонатальном, детском или юношеском возрасте, и имело бы определенный риск развития или имело бы диагноз наследственной дистрофии сетчатки, такой как врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA-1).

Кроме того, настоящее изобретение включает в себя также способ доставки млекопитающему, в случае необходимости, терапевтически эффективного количества биологически активного пептида, полипептида или белка гуанилатциклазы млекопитающего. Такой способ обычно включает в себя по меньшей мере стадию введения в соответствующие клетки млекопитающего, в случае необходимости такого введения, эффективного количества одного или нескольких описанных здесь векторов гAAV в

течение периода, достаточного для продуцирования на его основе биологически активного пептида, полипептида или белка гуанилатциклазы по меньшей мере в первой популяции клеток или по меньшей мере в первой ткани млекопитающего, в которую введен указанный вектор гAAV. При использовании указанного способа предпочтительно, чтобы нуждающееся в этом млекопитающее имело один или несколько дефектов, дефицитов или же существенное или полное отсутствие функционального, биологически активного белка *retGC1* в одной или нескольких тканях внутри или в непосредственной близости от тела млекопитающего по сравнению с уровнем биологически активного белка *retGC1* у млекопитающего в норме. В определенных приложениях настоящего способа многочисленные клетки из организма млекопитающего *ex vivo* или *in vitro* снабжают вектором гAAV, при этом указанный способ включает в себя, кроме того, дополнительную стадию последующего введения указанного множества клеток, снабженных вектором гAAV, по меньшей мере на участок первой ткани внутри или в непосредственной близости от тела млекопитающего. Например, указанное множество полученных клеток может быть введено по меньшей мере в первый участок внутри одного или обоих глаз млекопитающего, включая, например, введение путем прямой инъекции в сетчатку, в субретинальное пространство или в одну или в несколько тканей, окружающих сетчатку, или же в цельный глаз, или в ткани, окружающие глаз.

В конкретных аспектах введение конструкции с гAAV-регулируемым вектором гуанилатциклазного гена в клетку и его последующей экспрессией обеспечивает трансляцию функционального гуанилатциклазного пептида, белка или полипептида и в результате предохранение колбочковых фоторецепторов и восстановление опосредованной колбочками функции. Важно то, что такой способ обеспечивает возврат к нормальному зрительному восприятию в глазу млекопитающего и предпочтительно восстановление зрения.

Введение векторов гAAV согласно настоящему изобретению может быть частью однократной терапии или же может быть частью продолжительного режима терапии, повторяющейся два или более раз в течение жизни подвергаемого лечению субъекта. В определенных аспектах однократное введение конструкций гAAV вызывает поддерживаемое образование гуанилатциклазного белка с предохранением колбочковых фоторецепторов и восстановлением опосредованной колбочками функции и нормального зрительного восприятия в течение периода по меньшей мере в один месяц, по меньшей мере в два месяца, по меньшей мере в три или более месяцев после введения. Более предпочтительно, чтобы долговременная терапия или профилактика осуществлялись путем однократного введения или путем нескольких последовательных введений терапевтических конструкций в глаз млекопитающего в течение периода от нескольких месяцев до нескольких лет.

Предпочтительно, чтобы предохранение колбочковых фоторецепторов и восстановление опосредованной колбочками функции и нормального зрительного восприятия у млекопитающего происходили в течение периода по меньшей мере в четыре месяца, по меньшей мере в пять месяцев, по меньшей мере в шесть или более месяцев после введения. В определенных аспектах предохранение колбочковых фоторецепторов и восстановление опосредованной колбочками функции и нормального зрительного восприятия у млекопитающего происходили в течение периода по меньшей мере в один год, по меньшей мере в два года, по меньшей мере в три года или по меньшей мере в четыре или более года после завершения схемы лечения, которая включает в себя введение описанных здесь композиций. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу повышения уровня биологически активного белка *retGC1* в одной или нескольких клетках сетчатки млекопитающего, у которого имеется LCA1, подразумевается, что имеется LCA1, у которого диагностирован LCA1 или же есть определенный риск развития LCA1. Такой способ обычно включает в себя введение по меньшей мере в первую популяцию клеток сетчатки млекопитающего, в случае необходимости, одной или нескольких из описанных гуанилатциклазных векторных гAAV-конструкций в таком количестве и в течение такого периода, которые эффективны для повышения уровня биологически активного белка *retGC1* в одну или несколько клеток сетчатки млекопитающего. Такой способ предусмотрен, в частности, для предотвращения, лечения или облегчения одного или нескольких симптомов дистрофии сетчатки у млекопитающего, и он предпочтительно может включать в себя прямое или опосредованное введение в сетчатку, в субретинальное пространство или в глаз млекопитающего одной или нескольких из описанных здесь терапевтических конструкций в таком количестве и в течение такого периода, которых достаточно для лечения или облегчения одного или нескольких симптомов дистрофии сетчатки у млекопитающего.

В настоящем изобретении представлены также композиции и способы предотвращения, лечения или облегчения симптомов дефицита гуанилатциклазного белка у млекопитающего и, в частности, способы лечения или уменьшения степени тяжести или выраженности дефицита у человека с проявлениями одного или нескольких из расстройств, связанных с дефицитом биологически активных полипептидов гуанилатциклазы. В широком смысле указанный способ включает в себя введение по меньшей мере первой генетической конструкции на основе гAAV, которая кодирует один или несколько гуанилатциклазных пептидов, полипептидов или белков, в составе фармацевтически приемлемого носителя, животному, в таком количестве и в течение такого периода, которых достаточно для лечения или облегчения дефицита у животного, которое предположительно страдает от такого расстройства или же от одного или нескольких его симптомов. Примеры гуанилатциклазных полипептидов, применимых при реализации на-

стоящего изобретения, включают в себя, но не ограничены, пептиды, полипептиды и белки, которые обладают гуанилатциклазной активностью и которые по существу идентичны по своей первичной аминокислотной последовательности любой из последовательностей, представленных последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 и их биологически функциональными эквивалентами или производными. Дополнительные примеры гуанилатциклазных пептидов, белков и полипептидов, применимых при реализации настоящего изобретения, но не ограниченных ими, являются таковые, которые содержат, по существу состоят или состоят из аминокислотной последовательности, кодируемой геном гуанилатциклазы млекопитающего, и, в частности, тех последовательностей, которые представлены последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 и их биологически функциональными эквивалентами или производными.

gAAV-гуанилатциклазные векторные композиции.

В первом воплощении настоящее изобретение относится к вектору gAAV, содержащему полипептид, который включает в себя по меньшей мере первый сегмент нуклеиновой кислоты, которая кодирует гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид и, в частности, гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид млекопитающего (или его биологически активный фрагмент или производное), оперативно связанный по меньшей мере с первым промотором, способным к экспрессии сегмента нуклеиновой кислоты в соответствующей клетке-хозяине, трансформированной таким вектором. В предпочтительных воплощениях указанный сегмент нуклеиновой кислоты кодирует гуанилатциклазный белок, пептид или полипептид млекопитающего и, в частности, гуанилатциклазный пептид, полипептид или белок человека, а в особенности пептид, полипептид или белок, который включает в себя по меньшей мере первую последовательность смежных аминокислот, которая по меньшей мере на 90% гомологична по меньшей мере последовательности первых 30 смежных аминокислот из одной или нескольких из аминокислотных последовательностей, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, или ее биологически активному фрагменту или варианту.

Предпочтительно, чтобы указанный полипептид содержал по меньшей мере первую последовательность смежных аминокислот, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% гомологична по меньшей мере последовательности первых 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 80 смежных аминокислот из последовательности SEQ ID NO: 1, и более предпочтительно, чтобы указанный полипептид содержал по меньшей мере первую последовательность смежных аминокислот, которая по меньшей мере на 99% гомологична по меньшей мере последовательности из 90 смежных аминокислот из последовательности SEQ ID NO: 1.

Альтернативно, терапевтические конструкции согласно настоящему изобретению могут заключать в себе сегменты нуклеиновых кислот, которые кодируют гуанилатциклазные полипептиды любого вида млекопитающих, такие, например, как нуклеиновые кислоты, пептиды и полипептиды мышиных, приматов, заячьих, овечьих, свиных, бычьих, лошадиных, козлиных, собачьих, кошачьих и/или волчьих, или могут включать в себя модифицированные или подвергнутые сайт-специфическому мутагенезу сегменты нуклеиновых кислот, которые были исходно получены из одного или нескольких видов млекопитающих и генетически модифицированы, с тем, чтобы они могли быть экспрессированы в клетках человека так, чтобы их гуанилатциклазная активность сохранялась.

В других предпочтительных воплощениях указанные сегменты нуклеиновой кислоты для применения при осуществлении настоящего изобретения кодируют гуанилатциклазный полипептид млекопитающего и, в частности, человеческий гуанилатциклазный полипептид или его биологически активный фрагмент или вариант.

Полинуклеотиды, содержащиеся в векторах и в вирусных частицах согласно настоящему изобретению, предпочтительно включают в себя, как здесь описано, по меньшей мере первый конститутивный или индуцибельный промотор, оперативно связанный с сегментом нуклеиновой кислоты, кодирующей гуанилатциклазу. Такие промоторы могут быть гомологичными или гетерологичными промоторами и могут быть оперативно расположены выше сегмента нуклеиновой кислоты, кодирующего гуанилатциклазный полипептид, так, чтобы экспрессия сегмента, кодирующего гуанилатциклазу, была под контролем указанного промотора. Указанная конструкция может содержать единственный промотор или, альтернативно, могут быть использованы два или несколько промоторов для облегчения экспрессии последовательности ДНК, кодирующей гуанилатциклазу.

Примеры промоторов, используемых при осуществлении настоящего изобретения, включают в себя, но никоим образом не ограничены, такими промоторными последовательностями, которые являются оперативными в клетках-хозяевах, тканях и органах млекопитающих и, в частности, человека, такие, например, как убиквитарные промоторы, такие как промотор CMV, промотор, промотор  $\beta$ -актина, гибридный промотор CMV, гибридный промотор CMV- $\beta$ -актина, укороченный промотор CMV, укороченный

промотор  $\beta$ -актина, укороченный гибридный промотор CMV- $\beta$ -актина, промотор EF1, промотор U1a или промотор U1b; или же один или несколько клеточно- или тканеспецифических промоторов (включая, например, фоторецептор-специфический промотор, такой как промотор родопсинкиназы [hGRK1]), или индуцибельный промотор, такой как Tet-индуцибельный промотор или промотор VP16-LexA.

В иллюстративных воплощениях полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид, помещали под контроль убиквитарного укороченного гибридного промотора  $\beta$ -актина цыпленка (CBA) или под контроль промотора, специфичного в отношении фоторецепторных клеток, hGRK1), и использовали для получения терапевтически эффективных уровней кодируемого гуанилатциклазного полипептида в условиях, когда соответствующие клетки-хозяева были трансформированы указанной конструкцией, и в таких клетках экспрессировалась ДНК, кодирующая гуанилатциклазный полипептид. Пример подходящего промотора hGRK1 представлен последовательностью SEQ ID NO: 12, тогда как подходящий убиквитарный промотор, такой как укороченный гибридный промотор  $\beta$ -актина цыпленка (CBA), представлен последовательностью SEQ ID NO: 13.

Полинуклеотиды, содержащиеся в векторах и вирусных частицах согласно настоящему изобретению могут также дополнительно и необязательно включать в себя один или несколько нативных, синтетических, гомологичных, гетерологичных или гибридных энхансеров или 5'-регуляторных элементов, например природный энхансер, такой как энхансер CMV, или, альтернативно, синтетический энхансер. Клеточно- или тканеспецифичные энхансеры, включая, например, такие, которые усиливают экспрессию последовательностей оперативно связанных генов, также считаются особенно полезными в практическом осуществлении настоящего изобретения. Такие энхансеры могут включать в себя, но не ограничены, энхансеры, специфичные в отношении сетчатки, энхансеры, специфичные в отношении палочковидных зрительных фоторецепторов, энхансеры, специфичные в отношении колбочковидных зрительных фоторецепторов, энхансеры, специфичные в отношении колбочковидных зрительных клеток, и т.п.

Полинуклеотидные сегменты и сегменты нуклеиновых кислот, содержащиеся внутри векторов и вирусных частиц согласно настоящему изобретению, могут также дополнительно и необязательно включать в себя одну или несколько интронных последовательностей. В таких случаях указанная интронная последовательность(и) предпочтительно будут последовательностями млекопитающих и более предпочтительно человеческими последовательностями.

Последовательности ДНК, сегментов нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, содержащиеся внутри вектора, вириона, вирусной частицы, клетки-хозяева или композиции согласно настоящему изобретению, могут также дополнительно и необязательно включать в себя один или несколько нативных, синтетических, гомологичных, гетерологичных или гибридных посттранскрипционных или 3'-регуляторных элементов, оперативно расположенных относительно описанных здесь сегментов нуклеиновой кислоты, кодирующих гуанилатциклазу, чтобы обеспечить более высокий уровень экспрессии, большую стабильность и/или усиленную трансляцию кодируемых полипептидов. Одним из таких примеров является посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесного североамериканского сурка (WPRE), оперативно расположенный ниже гуанилатциклазного гена. Использование такого рода элементов в таких случаях хорошо известно специалистам в области молекулярной биологии.

В иллюстративных воплощениях настоящее изобретение относится к введению одного или нескольких биологически активных гуанилатциклазных белков, пептидов или полипептидов, которые содержат последовательность по меньшей мере приблизительно из 10, по меньшей мере приблизительно из 15, по меньшей мере приблизительно из 20, по меньшей мере приблизительно из 25, по меньшей мере приблизительно из 30, по меньшей мере приблизительно из 35, по меньшей мере приблизительно из 40, по меньшей мере приблизительно из 45, по меньшей мере приблизительно из 50, по меньшей мере приблизительно из 55, по меньшей мере приблизительно из 60, по меньшей мере приблизительно из 65, по меньшей мере приблизительно из 70, по меньшей мере приблизительно из 75, по меньшей мере приблизительно из 80, по меньшей мере приблизительно из 85, по меньшей мере приблизительно из 90, по меньшей мере приблизительно из 95 или по меньшей мере приблизительно из 100 или более смежных аминокислот из описанных здесь ниже полипептидных и пептидных последовательностей, и, в частности, тех полипептидов, которые приведены в одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 11.

Сходным образом, в дополнительных иллюстративных воплощениях настоящее изобретение относится к введению одного или нескольких биологически активных гуанилатциклазных белков, пептидов или полипептидов, которые кодируются сегментом нуклеиновой кислоты, который включает в себя, по существу состоит или состоит по меньшей мере приблизительно из 10, по меньшей мере приблизительно из 20, по меньшей мере приблизительно из 30, по меньшей мере приблизительно из 40, по меньшей мере приблизительно из 50, по меньшей мере приблизительно из 60, по меньшей мере приблизительно из 70, по меньшей мере приблизительно из 80, по меньшей мере приблизительно из 90, по меньшей мере приблизительно из 100, по меньшей мере приблизительно из 110, по меньшей мере приблизительно из 120, по меньшей мере приблизительно из 130, по меньшей мере приблизительно из 140, по меньшей мере

приблизительно из 150, по меньшей мере приблизительно из 160, по меньшей мере приблизительно из 170, по меньшей мере приблизительно из 180, по меньшей мере приблизительно из 190 или по меньшей мере приблизительно из 200, приблизительно из 250, приблизительно из 300, приблизительно из 350, приблизительно из 400, приблизительно из 450, приблизительно из 500, приблизительно из 550, приблизительно из 600, приблизительно из 650, приблизительно из 700, приблизительно из 750 или даже приблизительно из 800 или более смежных остатков нуклеиновой кислоты из описанных здесь ниже сегментов нуклеиновой кислоты и, в частности, таких сегментов ДНК, которые кодируют любой какой-нибудь один или несколько гуанилатциклазных белков млекопитающих, включая, например, такие, которые приведены в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Иллюстративные аденоассоциированные конструкции вирусных векторов и полинуклеотидов согласно настоящему изобретению включают в себя такие, которые включают в себя, по существу состоят или состоят по меньшей мере из первого сегмента нуклеиновой кислоты, который кодирует пептид или полипептид, который по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, где указанный пептид или полипептид обладает гуанилатциклазной активностью, когда экспрессируется в выбранных клетках и/или тканях млекопитающего.

В определенных воплощениях указанные конструкции вирусных векторов и полинуклеотидов согласно настоящему изобретению будут предпочтительно включать в себя такие векторы и полинуклеотиды, которые включают в себя, по существу состоят или состоят по меньшей мере из первого сегмента нуклеиновой кислоты, который кодирует пептид или полипептид, который по меньшей мере приблизительно на 82%, по меньшей мере приблизительно на 84%, по меньшей мере приблизительно на 86%, по меньшей мере приблизительно на 88%, по меньшей мере приблизительно на 92% или по меньшей мере приблизительно на 94% идентичен одной или нескольким из последовательностей, отраженных в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. Такие конструкции предпочтительно будут кодировать один или несколько биологически активных пептидов или полипептидов, которые обладают гуанилатциклазной активностью, когда экспрессируются в выбранных клетках и/или тканях млекопитающего и, в частности, в клетках и/или тканях человека.

Иллюстративные полинуклеотиды согласно настоящему изобретению включают в себя также такие последовательности, которые включают в себя, по существу состоят или состоят по меньшей мере из первого сегмента нуклеиновой кислоты, который по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует любую какую-нибудь из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, где указанный пептид или полипептид, кодируемый указанным сегментом нуклеиновой кислоты, обладает гуанилатциклазной активностью, когда экспрессируются в выбранных клетках и/или тканях млекопитающего.

Вирусные частицы и вирионы и содержащие их клетки-хозяева.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к частицам и вирионам gAAV, которые содержат гуанилатциклазные векторы gAAV согласно настоящему изобретению, к множеству таких частиц и вирионов, а также к фармацевтическим композициям и клеткам-хозяевам, которые содержат один или несколько описанных здесь гуанилатциклазных векторов gAAV, таким, например, как фармацевтические композиции гуанилатциклазных векторов или вирионов gAAV, которые предполагается вводить млекопитающим соответствующими путями введения, такими как внутримышечное, внутривенное введение, или путем прямой инъекции в выбранные клетки, ткани или органы млекопитающего, например в одну или несколько областей глаза выбранного млекопитающего. Обычно такие композиции будут составлены с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, буферами, разбавителями, адьювантами или носителями, как описано здесь ниже, и могут дополнительно включать в себя одну или несколько композиций липосом, липидов, липидных комплексов, микросфер, микрочастиц, наносфер или наночастиц для облегчения введения в выбранные органы, ткани и клетки, для которых указанная терапия является желательной.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения включают в себя клетки-хозяева млекопитающего, а также их множество, которые содержат один или несколько из векторов, вирионов или инфекцион-

ных вирусных частиц, как здесь описано. Особенно предпочтительными клетками являются человеческие клетки-хозяева и, в частности, клетки тканей глаза человека, включая, например, клетки сетчатки.

Терапевтические наборы и фармацевтические композиции.

Терапевтические наборы для лечения или облегчения симптомов состояния, наступающего в результате дефицита гуанилатциклазы у млекопитающего, также являются частью настоящего изобретения. Иллюстративными наборами являются такие, которые предпочтительно включают в себя одну или несколько из описанных AAV-гуанилатциклазных конструкций векторов, вирионов или описанных здесь фармацевтических композиций, а также инструкции по использованию указанного набора. Применение таких наборов в способах лечения гуанилатциклазных дефицитов, в частности специфичной в отношении сетчатки гуанилатциклазы-1, является предпочтительным при лечении дефекта или дефицита retGC1 и при лечении дистрофий сетчатки, таких как LCA-1, у пораженного млекопитающего.

Другой важный аспект настоящего изобретения относится к применению описанных векторов, вирионов, композиций и клеток-хозяев, описанных в настоящем документе, при изготовлении лекарственных средств для лечения или облегчения симптомов дефицита гуанилатциклазы у млекопитающего, и в частности, у человека. Применение таких композиций для изготовления лекарственных средств и в способах лечения неврологических дефектов и/или дефектов центральной нервной системы, включая, например, состояния, являющиеся результатом дефицита или дефекта в GC1 сетчатки, такие, например, как дистрофии сетчатки, такие как LCA-1, обычно включает в себя введение млекопитающему, в частности человеку, в случае необходимости, одного или нескольких из описанных здесь вирусных векторов, вирионов, клеток-хозяев или композиций, содержащих один или более из перечисленных компонентов, в количестве и в течение периода, достаточного для лечения или облегчения симптомов такого дефицита у пораженного им млекопитающего. Указанные способы могут также охватывать профилактическое лечение животных, у которых подозревается наличие таких состояний, или введение таких композиций тем животным, у которых есть риск развития таких состояний либо на основании установления диагноза, либо до возникновения симптомов.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, которые включают в себя один или несколько описанных аденоассоциированных вирусных векторов, вирионов, вирусных частиц и клеток-хозяев, как здесь описано. Содержащие их фармацевтические композиции являются особенно предпочтительными для применения в терапии и, в частности, в изготовлении лекарственных средств для лечения пораженных животных, в частности человека.

Способы терапии.

Настоящее изобретение относится также к способам доставки терапевтически эффективных количеств гуанилатциклазного полипептида млекопитающему, в случае необходимости. Такие способы обычно включают в себя по меньшей мере стадию доставки или введения такому млекопитающему одной или нескольких из описанных здесь гуанилатциклазных композиций. Например, такой способ может включать в себя доставку такому млекопитающему одного или нескольких из векторов, вирионов, вирусных частиц, клеток-хозяев гAAV или фармацевтических композиций, как здесь описано. Предпочтительно, чтобы такая доставка или такое введение осуществлялось бы в количестве и в течение периода, обеспечивающих терапевтически эффективное количество одного или нескольких из описанных здесь полипептидов гуанилатциклазы выбранным клеткам, тканям или органам млекопитающего и, в частности, терапевтически эффективные уровни клеткам глаза млекопитающего. Такие способы могут включать в себя системную инъекцию (инъекции) терапевтического средства или могут даже включать в себя прямое или не прямое введение, инъекцию или внесение терапевтических композиций в конкретные клетки, ткани или органы млекопитающего.

Например, указанная терапевтическая композиция может быть доставлена млекопитающему путем прямой инъекции в ткани глаза или в сетчатку, или в субретинальное пространство, или же в один или несколько конкретных типов клеток внутри глаза млекопитающего.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения, облегчения симптомов и уменьшения степени тяжести дефицита гуанилатциклазы у животного. Указанные способы обычно включают в себя по меньшей мере стадию доставки животному, в случае необходимости, одной или нескольких описанных здесь композиций гуанилатциклазных векторов гAAV в количестве и в течение периода, эффективных для лечения дефекта или дефицита полипептида retGC1 или для лечения дисфункции, происходящей в результате такого накопления или происходящей в результате уменьшения экспрессии или отсутствия достаточного количества биологически активного полипептида гуанилатциклазы у животного, включая дистрофии сетчатки, такие как LCA1, и т.п. Как описано выше, такие способы могут включать в себя системную инъекцию(и) терапевтического средства или могут даже включать в себя прямое или не прямое введение, инъекцию или внесение терапевтических композиций в конкретные клетки, ткани или органы млекопитающего.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению аденоассоциированных вирусных векторов, вирионов, вирусных частиц и клеток-хозяев и/или описанных здесь фармацевтических композиций в изготовлении лекарственного средства для лечения дефекта или дефицита гуанилатциклазы, дистрофии сетчатки или LCA1 или другого GC1-связанного глазного заболевания, расстройства или

дисфункции у млекопитающего. Такое применение может включать в себя системную или локализованную инъекцию, инфицирование или введение в одну или несколько клеток, тканей или органов млекопитающего. Такое применение, в частности, предусмотрено для человека, у которого либо имеется, либо предполагается наличие, либо есть определенный риск развития одной или нескольких дистрофий сетчатки, таких как LCA-1.

#### Краткое описание графического материала

Последующие фигуры образуют часть настоящего описания и включены в него для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше понято со ссылкой на последующее описание в сочетании с сопровождающими фигурами, где соответствующие номера ссылок способствуют идентификации соответствующих элементов, на которых:

на фиг. 1 приведены репрезентативные опосредованные колбочковидными (левая колонка) и палочковидными зрительными клетками (правая колонка) картины электроретинограмм (ERG) у мышей +/- (верхние временные диаграммы), мышей, не обработанных GC1KO (средние временные диаграммы), и AAV-mGC1-обработанных мышей (нижние временные диаграммы). Сплошные линии записи прибора-самописца соответствуют глазам, в которые инъекцировали hGRK1-mGC1 (нижние временные диаграммы), и контралатеральным глазам, в которые такие инъекции не производились (средние временные диаграммы). Пунктирные линии записи самописца соответствуют глазам, в которые инъекцировали smCBA-mGC1 (нижние временные диаграммы), и контралатеральным глазам, в которые такие инъекции не производились (средние временные диаграммы). Реакции колбочковидных зрительных клеток в глазах, обработанных AAV-mGC1, восстанавливались приблизительно до 45% от нормы;

на фиг. 2A и 2B приведены средние значения максимальных амплитуд фотопических бета-волн, относящихся к световой адаптации колбочек у мышей GC1KO, изогенных контролей +/-, smCBA-mGC1-обработанных (фиг. 2A) и hGRK1-mGC1-обработанных (фиг. 2B) GC1KO-мышей с течением времени. Реакция колбочковидных зрительных клеток GC1KO-мышей, обработанных как smCBA-mGC1, так и hGRK1-mGC1, приблизительно составляет 45% от нормального ответа по меньшей мере в течение 3 месяцев после инъекции;

на фиг. 3A-3C представлена полученная оптомоторным анализом иллюстрация того, что зрительно-реактивное поведение восстанавливалось у мышей GC1KO, обработанных либо smCBA-mGC1, либо hGRK1-mGC1. M1-M9 соответствует девяти использованным для тестирования мышам. При проверке остроты зрения и контрастной чувствительности контрольных мышей +/- (M1, M2), интактных мышей GC1KO (M3, M4), smCBA-mGC1-обработанных (M5, M6, M7) и hGRK1-mGC1-обработанных (M8, M9) мышей было выявлено, что поведение мышей было сходно таковому у мышей с нормальным зрением (фиг. 3B и 3C). Представлены средние значения по всем глазам +/- (n=4), глазам GC1KO (n=9) и AAV-mGC1-обработанным глазам (n=5) (фиг. 3C). Для электрофизиологического сравнения приведены опосредованные колбочками ответные электроретинограммы (ERG) от каждой мыши (M1-M9) (фиг. 3A);

на фиг. 4A-4F показана экспрессия GC1 под действием AAV5-hGRK1-mGC1 в наружных сегментах мышей GC1KO (фиг. 4A). Отсутствие экспрессии GC1 наблюдается в необработанном контралатеральном контрольном глазу (фиг. 4B). Экспрессия GC1 под действием AAV5-smCBA-mGC1 в наружных фоторецепторных сегментах (фиг. 4C) и время от времени собственно в самих фоторецепторных клетках (белые стрелки на фиг. 4F). Отсутствие такой экспрессии GC1 наблюдается в необработанном контралатеральном контрольном глазу (фиг. 4D). Уровни терапевтической трансгенной экспрессии в AAV5-mGC1-обработанных глазах сходны с таковой, наблюдаемой в изогенных контрольных глазах +/- (фиг. 4E). Все сетчатки брали у мышей через 3 месяца после обработки или у необработанных контрольных мышей соответствующих возрастов. Масштабные линейки на фиг. 4A = 100 мкм; на фиг. 4F = 25 мкм. OS = наружные сегменты, IS = внутренние сегменты, ONL = наружный ядерный слой;

на фиг. 5A-5D показана экспрессия аррестина колбочек в колбочковидных зрительных фоторецепторах мышей +/-, мышей GC1KO, AAV5-smCBA-mGC1-обработанных и AAV5-hGRK1-mGC1-обработанных мышей. Необработанные сетчатки мышей GC1KO содержат характерные беспорядочные отслоившиеся наружные сегменты колбочек (фиг. 5B), тогда как у обработанных GC1KO наружные сегменты колбочек были интактными и распределение аррестина колбочек выглядело нормальным на срезах сетчатки у обработанных мышей GC1KO (фиг. 5C и 5D) и мышей +/- (фиг. 5A). Все сетчатки были взяты у мышей через 3 месяца после обработки или у необработанных контролей соответствующих возрастов. Масштабные линейки на фиг. 5D = 100 мкм. OS = наружные сегменты, IS = внутренние сегменты, S = окончания синапсов;

на фиг. 6A-6D показаны результаты обработки AAV-mGC1 в отношении предохранения колбочковидных зрительных фоторецепторов в обработанных глазах по меньшей мере в течение 3 месяцев после обработки. Репрезентативные тотальные препараты сетчатки из исследования hGRK1-mGC1 (фиг. 6A: "no TX" = необработанные; фиг. 6C: "TX" = обработанные) и из исследования smCBA-mGC1 (фиг. 6B: "no TX" = необработанные; фиг. 6D: "TX" = обработанные), а также из контралатеральных глаз, в которые не осуществляли инъекции, окрашенных на предмет обнаружения аррестина колбочек, позволили выявить, что фоторецепторы колбочек защищены у мышей GC1KO, обработанных AAV-mGC1, по меньшей мере в течение 3 месяцев после обработки. Плотности клеток колбочковидных зрительных фо-

торецепторов подсчитывали в центральных и нижерасположенных слоях сетчатки обработанных и не обработанных мышей. Значительные различия были обнаружены в обеих зонах после обработки каждым из вирусных векторов;

на фиг. 7 проиллюстрирован каскад фотопреобразования у позвоночных. Под действием стимуляции светом конформационные изменения в родопсине (R) вызывают каскад явлений, включая активацию трансдуцина (Т) и фосфодиэстеразы цГМФ (PDE), что в конечном счете приводит к гидролизу цГМФ. Такое уменьшение уровня внутриклеточного цГМФ вызывает закрытие воротных каналов циклических нуклеотидов (CNG) в наружных сегментах мембран фоторецепторов. Закрытие указанных каналов вызывает гиперполяризацию клетки и, следовательно, драматический спад уровня внутриклеточного кальция. Когда уровни кальция падают, несвязанный активирующий гуанилатциклазу белок (GCAP) свободен для стимуляции гуанилатциклазы (GC). GC играет роль в восстановительной фазе фотопреобразования, когда его целью является продуцирование цГМФ. Когда уровни цГМФ достаточно повышены под действием GC, цГМФ-воротные каналы вновь открываются, вызывая деполяризацию клетки и возврат к адаптированному к темноте состоянию;

на фиг. 8 приведена предсказанная структура и топология *retGC1*, которая проявляет гомологию с другими гуанилатциклазами с единственной трансмембранной областью петли, внутриклеточным и внеклеточным доменом. Кроме того, внутриклеточный домен разделен на "киназоподобную" область и каталитический домен. Кальций- и GCAP1-зависимая регуляция *retGC1* регулируется через внутриклеточные домены (KHD). Когда концентрация кальция в клетке фоторецептора высокая (в темном/деполяризованном состоянии), кальций-связанный GCAP1 предотвращает активацию *retGC1*. При световой стимуляции уровни кальция снижаются. Кальций высвобождается из GCAP1, тем самым позволяя GCAP1 активировать *retGC1*. Роль *retGC1* заключается в том, чтобы продуцировать цГМФ;

на фиг. 9 изображены фоторецепторы колбочек у нормальных (WT) мышей и мышей GC1KO. В колбочках мышей WT, GC1 функционирует нормально, продуцируя цГМФ, который может эффективно повторно открывать CNG-воротные каналы и возвращать клетку в ее адаптированное к темноте/деполяризованное состояние. В фоторецепторах колбочек мышей GC1KO GC1 не способна продуцировать цГМФ. Это препятствует повторному открытию CNG-воротных каналов. Такие клетки являются, по существу, хронически гиперполяризованными (адаптированными к свету). Они не преобразуют свет для зрения (что подтверждается отсутствием ERG) и в конечном счете подвергнутся вырождению;

на фиг. 10 представлено выравнивание аминокислотной последовательности бычьей GC1 (*bov GC1*) и мышшиной GC1 (*mGC1*) с включенной консенсусной последовательностью. Варибельная область, локализованная в N-концевой части, выделена прямоугольником;

на фиг. 11 приведены карты двух иллюстративных векторов. Один из них содержит убиквитарный промотор *smCBA*, тогда как другой использует фоторецептор-специфический промотор, *hGRK1*;

на фиг. 12 представлен репрезентативный срез сетчатки глаза мышей GC1KO, в который инъецировали AAV5-*smCBA-mGC1*, и окрашенный на GC1 и на лецитин PNA, в котором в наружных сегментах колбочек выявляется экспрессия GC1 (верхний слой), так же как и в наружных сегментах палочек. Такая же картина была выявлена и в *hGRK1-mGC1*-инъецированных глазах;

на фиг. 13A-13C показано AAV-опосредованное восстановление функции сетчатки у мышей GC1KO.

Фиг. 13A: репрезентативные фотопические (опосредованные колбочками) картины электроретинограмм (ERG), полученных из глаз мышей GC1KO на сроке ~P14, обработанных AAV5-*hGRK1-mGC1*, AAV5-*smCBA-mGC1* или AAV8(Y733F)-*hGRK1-mGC1* или соответствующих по возрасту изогенных контролей GC1<sup>+/+</sup>. Картины электроретинограмм получали через 4 месяца (слева), 7 месяцев (посередине) и 9 месяцев (справа) после инъекции.

Фиг. 13B: средние значения амплитуд фотопических бета-волн, получаемых ежемесячно под действием стимула в 12 кд-ср/м<sup>2</sup> (кандела-стерадиан/м<sup>2</sup> (cds/m<sup>2</sup>)) у обработанных мышей GC1KO, необработанных мышей GC1KO и соответствующих по возрасту изогенных контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>.

Фиг. 13C: скотопические (опосредованные палочками) ответные реакции у обработанных и необработанных мышей GC1KO с течением времени. Значения представляют собой отношение амплитуд палочковидных бета-волн, получаемых при 5 кд-ср/м<sup>2</sup> на обработанных и необработанных глазах. Все три вектора обеспечивали стабильную долговременную терапию мышам GC1KO, при этом обработка AAV8(Y733F)-*hGRK1-mGC1* была наиболее эффективной;

фиг. 14: мышей GC1KO, обработанных AAV8(Y733F)-*hGRK1-mGC1*, забивали через 7 месяцев после инъекции. AAV5-*smCBA-mGC1*-обработанных и AAV5-*hGRK1-mGC1*-обработанных мышей забивали через 9 месяцев после инъекции. Их глаза, так же как и глаза ~11-месячных мышей GC1<sup>+/+</sup>, разрезали и сетчатку окрашивали антителами, полученными против GC1 (верхний ряд) и аррестина колбочек (нижний ряд). Все три терапевтических вектора осуществляли экспрессию GC1 исключительно в фоторецепторах мышей GC1KO. Некоторое утончение сетчатки наблюдалось у AAV5-*hGRK1-mGC1*-обработанных мышей - результат, который можно скорее всего отнести за счет высокого титра указанного вектора. Экспрессия GC1 и плотность/морфология колбочек у мышей, обработанных AAV8(Y733F) и

обработанных AAV5-smCBA, напоминала таковую, наблюдаемую у соответствующих по возрасту контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>. И наоборот, в сетчатках соответствующих по возрасту мышей GC1KO было выявлено отсутствие экспрессии GC1 и значительное уменьшение плотности колбочковидных зрительных клеток;

на фиг. 15 представлена картина вестерн-блоттинга сетчаток одной мыши GC1KO, которая была забита через 7,5 месяцев после инъекции AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1. С помощью антител против GC1 показано, что уровень AAV-опосредованной экспрессии GC1 в глазу обработанной мыши GC1KO сходен с таковым в глазу соответствующих по возрасту изогенных контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>. Уровни экспрессии активирующего гуанилатциклаза белка-1 (GCAP1) (биохимического партнера гуанилатциклазы) также оценивали у обработанных и необработанных мышей GC1KO, а также в контрольных глазах GC1<sup>+/+</sup>. В соответствии с прежними сообщениями, белок GCAP1 вызывал тормозящий эффект в необработанных глазах мышей GC1KO. AAV-опосредованная экспрессия GC1 вызывает повышенную экспрессию GCAP1, сходную с уровнями, наблюдаемыми у изогенных контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>;

на фиг. 16A и 16B представлены результаты, полученные на одной мыши GC1KO, которая была забита через 11 месяцев после инъекции AAV5-smCBA-mGC1 и цельные сетчатки которой окрашивали антителом, полученным против аррестина колбочек. С помощью иммуостатина было выявлено, что, за исключением верхнего слоя сетчатки, в глазу необработанной мыши GC1KO колбочки отсутствуют (фиг. 16A). AAV-опосредованная экспрессия GC1 предохраняет колбочковидные фоторецепторы по всей толщине сетчатки обработанного глаза (фиг. 16B) в течение по меньшей мере 11 месяцев (последний срок наблюдения);

на фиг. 17 проиллюстрированы данные по мышам GC1KO, которых инъецировали AAV8(733)-hGRK1-mGC1 и забивали через 4 месяца и через 7 месяцев после инъекции. Мышей GC1KO, которых инъецировали AAV5-smCBA-mGC1 и AAV5-hGRK1-mGC1, забивали через 7 месяцев и через 10 месяцев после инъекции. Соответствующих по возрасту интактных мышей GC1KO использовали в качестве контролей. Оптические нервы из обработанных и необработанных глаз, а также части правого мозга и левого мозга, содержащие зрительные проводящие пути, были изолированы и использованы для воссоздания векторных геномов. При этом всегда AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 инъецировали мышам GC1KO в левый глаз, а оба вектора AAV5 инъецировали мышам GC1KO в правый глаз. Векторные геномы во всех случаях воссоздавали только из зрительных нервов обработанных глаз. По прошествии 10 месяцев после инъекции векторов AAV5 никаких векторных геномов из мозга воссоздать не удавалось. Наибольшее количество векторных геномов было воссоздано из мышей GC1KO, которых инъецировали сильным, быстродействующим вектором AAV8(733);

на фиг. 18A и 18B проиллюстрированы данные электроретинограмм (ERG) OCT и палочек/колбочек из мышей GCdko через 2 месяца после инъекции AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1;

на фиг. 19A и 19B проиллюстрированы данные репрезентативных электроретинограмм (ERG) палочек и колбочек из мышей GCdko через один месяц после инъекции AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1;

на фиг. 20A и 20B показаны стандарты RT-PCR в реальном времени. Интенсивность флуоресценции (логарифмические единицы по оси Y) отложена против пороговых значений Ct циклов (по оси X). Каждая панель представляет собой стандартные кривые (полученные путем серийного разведения тотальной кДНК сетчатки) для транскрипта GC1 и Gapdh с помощью кДНК сетчатки либо мышей дикого типа, GC1<sup>+/+</sup> (а), либо мышей GC1KO, обработанных AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1. Стандартные кривые, полученные с использованием набора праймеров GC1 и Gapdh, были параллельны таковым при использовании любой матрицы, что указывает на сходную кинетику амплификации. Значение цикла Ct увеличивается с уменьшением количества матрицы;

на фиг. 21A и 21B представлена экспрессия GC1 и аррестина колбочек в сетчатке обработанных и необработанных мышей GC1KO и контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>.

Фиг. 21A: иммуногистохимию замороженных поперечных срезов сетчатки использовали для определения локализации экспрессии векторов GC1 (верхний ряд) и аррестина колбочек (нижний ряд) у мышей GC1KO, обработанных AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 (через 7 месяцев после инъекции), AAV5-smCBA-mGC1 (через 10 месяцев после инъекции) или AAV5-hGRK1-mGC1 (через 10 месяцев после инъекции), а также сетчатки 8-месячных необработанных мышей GC1KO и контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>. Ядра окрашивали с помощью DAPI. Все срезы визуализировали при 20× увеличении и экспонировали в одинаковых условиях.

Фиг. 21B: иммуноокрашивание цельных препаратов сетчатки от одной мыши GC1KO через 11 месяцев после обработки AAV5-smCBA-mGC1 (только одного глаза) антителом против аррестина колбочек выявило значительный предохранительный эффект в отношении фоторецепторов колбочек в обработанном глазу (внизу справа) по сравнению с необработанным контралатеральным контрольным глазом (внизу слева). Цельные препараты сетчатки были сориентированы сходным образом с их темпоральными частями в положении на 12 часах. Части цельных препаратов визуализировали при 10× увеличении и соединяли вместе для окончательной презентации. OS = наружные сегменты; ONL = наружный ядерный слой; INL = внутренний ядерный слой;

на фиг. 22А и 22В представлены опосредованные колбочками электроретинограммы (ERG) обработанных и необработанных мышей GC1KO и необработанных контрольных глаз мышей GC1<sup>+/+</sup>.

Фиг. 22А: репрезентативные опосредованные колбочками электроретинограммы, полученные под действием светового стимула в 12 кд·ср/м<sup>2</sup> из глаз мышей GC1KO, обработанных AAV5-hGRK1-mGC1, AAV5-smCBA-mGC1 или AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 (черная линия), или из глаз необработанных соответствующих по возрасту контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>. Показаны репрезентативные электроретинограммы, полученные между 4-месячным и 1-годовалым интервалом после обработки (верхняя панель). Масштаб: ось у = 50 мкВ, ось х = 20 мс.

Фиг. 22В: максимальные амплитуды колбочковых бета-волн (вырабатываемые при 12 кд·ср/м<sup>2</sup>) рассчитывали для каждой мыши и усредняли помесечно для каждой группы обработки, а также для группы соответствующих по возрасту необработанных мышей GC1KO и контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>. Сравнения проводили между группами животных с n>3. Все AAV-обработанные группы статистически сравнивали с 6-месячным сроком после обработки. Глаза, обработанные вектором AAV5, статистически сравнивали с 9-месячным сроком после обработки;

на фиг. 23А и 23В представлены опосредованные палочками электроретинограммы (ERG) обработанных и необработанных мышей GC1KO и контрольных глаз мышей GC1<sup>+/+</sup>.

Фиг. 23А: амплитуды палочковых бета-волн (вверху слева) и амплитуды альфа-волн (вверху справа), полученные под действием стимула в 1 кд·ср/м<sup>2</sup> в скотопических условиях, определяли в обработанных и необработанных глазах мышей GC1KO, обработанных вектором AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, вектором AAV5-hGRK1-mGC1 или вектором AAV5-smCBA-mGC1. Межмышинные соотношения обработанных и необработанных глаз получали путем деления максимума амплитуды альфа-волн или бета-волн в обработанных глазах на максимум амплитуды в необработанном глазу. Указанные соотношения усредняли помесечно во всех обрабатываемых группах. Сравнения проводили между группами животных с n>3. Все AAV-обработанные группы статистически сравнивали с 6-месячным сроком после обработки. Векторы AAV5 статистически сравнивали с 9-месячным сроком после обработки. Опосредованное вектором улучшение определяли по среднему отношению >0,8.

Фиг. 23В: репрезентативные опосредованные палочками электроретинограммы (ERG) от одной мыши GC1KO показали, что реакции палочек из глаза, обработанного AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, были выше таковых, регистрируемых из необработанного контралатерального контрольного глаза. Указанная реакция палочек из обработанного глаза восстанавливалась до ~50% таковой нормальной реакции палочек GC1<sup>+/+</sup>;

и фиг. 24А и 24В приведены уровни белка и транскрипта в случае обработанных и необработанных мышей GC1KO и контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup>.

Фиг. 24А: иммуноблот лизатов сетчатки из глаза одной мыши GC1KO через 10 месяцев после обработки AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 и зондирования анти-GC1- и анти-GCAP1-антителами. Антитело против β-актина использовали в качестве внутреннего контроля загрузки.

Фиг. 24В: полуколичественная RT-PCR в режиме реального времени нескольких транскриптов (GC1, GCAP1, GNAT2 и PDE6α) в одной сетчатке GC1KO, обработанной AAV5-smCBA-mGC1, в одной сетчатке GC1KO, обработанной вектором AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, и в отдельных необработанных сетчатках GC1KO или контрольных сетчатках GC1<sup>+/+</sup>. Образцы выполняли в трех повторах с использованием Gapdh-специфических праймеров в качестве стандарта. Данные представлены в виде кратных изменений уровней мРНК относительно контроля GC1<sup>+/+</sup>.

#### Описание иллюстративных воплощений

Иллюстративные воплощения настоящего изобретения описаны ниже. В интересах большей ясности изложения, в настоящем документе описаны не все признаки фактической реализации. Конечно, следует иметь в виду, что фактически при разработке любого такого воплощения разработчиками должно быть принято некоторое количество специфических для каждого воплощения решений для достижения конкретных целей, таких как соблюдение соответствия с ограничениями, связанными с особенностями системы и бизнеса, которые будут меняться от одного варианта реализации к другому. Более того, следует иметь в виду, что такие усилия разработчиков могут быть комплексными и времяемкими, но тем не менее они будут рутинными для специалистов в той области, к которой относится настоящее описание.

Аденоассоциированный вирус.

Аденоассоциированный вирус-2 (AAV) является человеческим парвовирусом, который может распространяться и как литический вирус, и как провирус (Cukor et al., 1984; Hoggan et al., 1972). Вирусный геном состоит из линейной одноцепочечной ДНК (Rose et al., 1969), составляющей в длину 4679 оснований (Srivastava et al., 1983), фланкированной инвертированными концевыми повторами из 145 оснований (Lusby et al., 1982). Для литического роста AAV требуется со-инфицирование вирусом-помощником (вирусом-хелпером). Либо аденовирус (Atchinson et al., 1965; Hoggan, 1965; Parks et al., 1967), либо вирус простого герпеса (Buller et al., 1981) можно наделять хелперной функцией (функцией помощника). Без хелпера AAV-специфическая репликация или экспрессия генов неочевидна (Rose and Kocot, 1972; Carter et al., 1983). В отсутствие хелпера AAV может персистировать в виде интегрированного провируса

(Hoggan, 1965; Berns et al., 1975; Handa et al., 1977; Cheung et al., 1980; Berns et al., 1982).

Интеграция, по всей видимости, включает в себя рекомбинацию между концами AAV и хозяйскими последовательностями, и большинство последовательностей AAV остается интактными в составе провируса. Способность AAV интегрироваться в хозяйскую ДНК, по всей вероятности, является присущей ему от природы стратегией для надежного выживания последовательностей AAV в отсутствие вируса-помощника. Когда впоследствии клетки, несущие провирус AAV, суперинфицируют хелпером, с интегрированного генома AAV снимается блокада и возникает продуктивный литический цикл (Hoggan, 1965).

Последовательности AAV, клонированные в прокариотические плазмиды, являются инфекционными (Samulski et al., 1982). Например, когда плазмиду AAV/pBR322 дикого типа, pSM620, трансфицируют в человеческие клетки в присутствии аденовируса, последовательности AAV высвобождаются из плазмиды, и в результате получается нормальный литический цикл AAV (Samulski et al., 1982). Это дает возможность модифицировать последовательности AAV в рекомбинантной плазмиде, чтобы затем вырастить мутантный штамм вирусов путем трансфекции плазмиды в человеческие клетки (Samulski et al., 1983; Hermonat et al., 1984). AAV содержит по меньшей мере три фенотипически различные области (Hermonat et al., 1984). Область *тер* кодирует один или несколько белков, которые необходимы для репликации ДНК и для высвобождения из рекомбинантной плазмиды, тогда как области *сар* и *лр* нужны для кодирования капсидных белков AAV, и мутанты внутри этих областей способны к репликации ДНК (Hermonat et al., 1984). Показано, что концы AAV необходимы для репликации ДНК (Samulski et al., 1983).

Laughlin et al. (1983) описали конструкцию двух гибридных плазмид *E. coli*, каждая из которых содержит полную геномную ДНК AAV, и трансфекцию указанных рекомбинантных ДНК в линии клеток человека в присутствии хелперного рекомбинантного аденовируса для успешного высвобождения и репликации генома AAV (См. также Tratschin et al., 1984a; 1984b).

Аденоассоциированный вирус (AAV) является особенно привлекательным для переноса генов, поскольку он не вызывает какого бы то ни было патогенного ответа и может интегрироваться в хромосому клетки-хозяина (Kotin et al., 1990). Концевые повторы в AAV (TR) являются единственно существенными *цис*-компонентами для интеграции в хромосому (Muzyczka and McLaughlin, 1988). Сообщалось, что указанные TR обладают промоторной активностью (Flotte et al., 1993). Они могут осуществлять промоцию переноса эффективного гена из цитоплазмы в ядро или повышать стабильность плазмидной ДНК и способны к более длительной экспрессии генов (Bartlett and Samulski, 1998). Исследования с использованием рекомбинантных ДНК плазмид, содержащих концевые повторы AAV, привлекли значительный интерес. Показано, что плазмиды на основе AAV способны к более высокому уровню и более длительной экспрессии трансгенов, чем идентичные плазмиды, лишенные концевых повторов AAV в большинстве клеток разных типов (Philip et al., 1994; Shafroon et al., 1998; Wang et al., 1998).

Существует несколько факторов, которые ускорили исследователям изучение возможности использования гAAV в качестве экспрессирующего вектора. Одним из них является то, что требований, необходимых для доставки гена для его интеграции в хромосому хозяина, оказалось неожиданно мало. Необходимо иметь инвертированные концевые повторы (ITR) в 145 п.н., которые составляют только 6% генома AAV. Это оставляет в векторе место для присоединения ДНК-вставки размером в 4,5 т.н. Несмотря на то, что такая емкость может препятствовать AAV в доставке крупных генов, ее вполне достаточно для доставки бессмысловых конструкций согласно настоящему изобретению.

AAV, в силу его безопасности, является также хорошим выбором для доставки носителей. Существует относительно сложный механизм высвобождения: для мобилизации гAAV требуется не только аденовирус дикого типа, но также и гены AAV. Сходным образом, AAV не является патогенным и не ассоциирован с каким-либо заболеванием. Удаление вирусных кодирующих последовательностей минимизирует иммунные реакции на экспрессию вирусного генома, и следовательно, гAAV не вызывает воспалительного ответа. Следовательно, AAV является идеальным кандидатом для доставки кодирующих гуанилатциклазу полинуклеотидов согласно настоящему изобретению.

Продуцирование векторов.

Традиционные методики продуцирования векторов гAAV обычно основаны на трехкомпонентной системе. Одним компонентом указанной системы является провирусная плаزمиды, кодирующая упаковку рекомбинантной ДНК в виде гAAV. Такая рекомбинантная ДНК локализована в AAV-2 между инвертированными концевыми повторами (ITR) размером в 145 пар нуклеотидов (п.н.), которые являются минимальными *цис*-действующими последовательностями AAV-2, которые направляют репликацию и упаковку вектора. Вторым компонентом указанной системы является плазмиды, кодирующая гены AAV-2, *тер* и *сар*. Ген *тер* в AAV-2 кодирует четыре белка Rep (Rep 78, 68, 52 и 40), которые для репликации генома гAAV действуют в транс-форме, расщепляют репликативные промежуточные соединения, а затем упаковывают одноцепочечные геномы гAAV. Ген *сар* в AAV-2 кодирует три структурных белка (VP1, VP2 и VP3), которые образуют вирусную капсулу (капсид). Поскольку AAV-2 сам по себе реплицируется неохотно, третьим компонентом упаковывающей системы гAAV является набор хелперных функций из другой вирусной ДНК. Указанные хелперные функции создают клеточное окружение, в котором мо-

гут эффективно протекать процессы репликации и упаковки гAAV. Хелперные функции, обеспечиваемые аденовирусом (Ad), почти исключительно используются для продуцирования гAAV и кодируются генами E1a, E1b, E2a, E4orf6 и VA RNA. Несмотря на то, что первые два компонента указанной системы обычно вводят в клетки, в которых процессы репликации и упаковки осуществляются путем трансфекции, хелперные функции вводят путем суперинфицирования вирусом дикого типа Ad.

Традиционные технологии продуцирования гAAV ограничены их способностью продуцировать большие количества вектора в силу врожденной неэффективности их трансфекции. Серьезные трудности обнаруживаются также тогда, когда увеличивается масштаб трансфекции. Требованием к Ad дикого типа может быть также и уменьшение количества продуцируемого гAAV, поскольку Ad может конкурировать за клеточные и вирусные субстраты, которые необходимы для вирусной репликации, но присутствуют только в ограниченных количествах. Другой проблемой, обнаруживаемой в традиционных методиках продуцирования, является то, что суперинфицирование аденовирусом (Ad) требует разработки эффективных процедур очистки Ad от продуцируемого гAAV. Несмотря на то, что указанные процедуры очистки обычно являются успешными при элиминации примесей Ad из препаратов гAAV, они в то же время снижают титры гAAV. Необходимы также жесткие анализы на предмет определения наличия контаминации гAAV аденовирусом.

Для продуцирования гAAV используют процедуру двойной со-трансфекции, чтобы ввести векторную плазмиду гAAV для переноса генов вместе с pDG (Grimm et al., 1998). Хелперная плазида AAV, несущая гер- и сар-гены AAV, а также хелперные гены Ad, необходима для репликации и упаковки гAAV в молярном отношении 1:1. Плазмидную ДНК, используемую при трансфекции, очищали согласно общеприменимой методике щелочного лизиса/градиента CsCl. Трансфекцию производили следующим образом: клетки 293 накануне эксперимента разделяли в соотношении 1:2 с тем, чтобы при трансфекции конфлюентность клеток составляла 75-80%. Десять 15-см планшетов трансфицировали в составе одной партии. Для получения CaPO<sub>4</sub>-преципитата 0,7 мг pDG смешивали со 180 мкг векторной плазмиды для переноса генов гAAV в общем объеме 12,5 мл 0,25 М CaCl<sub>2</sub>. Старую среду удаляли из-под клеток и образование CaPO<sub>4</sub>-преципитата инициировали путем добавления 12,5 мл 2× HBS (pH 7,05), который предварительно нагревали до 37°C, к раствору ДНК-CaCl<sub>2</sub>. Указанную ДНК инкубировали в течение 1 мин и смесь переносили в 200 мл предварительно нагретой DMEM-10% ЭБС, затем образование преципитата останавливали. По 22 мл сразу же раскапывали в лунки каждого планшета и клетки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. CaPO<sub>4</sub>-преципитат оставался в клеточной среде в течение всего периода инкубации, не влияя на жизнеспособность клеток. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали путем центрифугирования при 1140×g в течение 10 мин. Затем клетки лизировали в 15 мл 0,15 М MGCl<sub>2</sub>, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,5) путем трехкратного замораживания/оттаивания в этаноле с сухим льдом и водяных банях с температурой 37°C. Бензоназу (Nucomed Pharma A/S, соответствующей степени очистки) добавляли к указанной смеси (в конечной концентрации 50 Ед./мл в конечной концентрации) и лизат инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Лизат осветляли путем центрифугирования при 3,700×g в течение 20 мин и вирусосодержащий супернатант дополнительно очищали, используя непрерывный градиент плотности.

Обычного непрерывного ступенчатого градиента достигают путем подслаивания и вытеснения менее плотного клеточного лизата йодиксанолом, 5,5"-[(2-гидрокси-1-3-пропандиил)-бис-(ацетиламино)] бис-[N,N'-бис-(2,3-дигидроксипропил-2-4,6-трийодо-1,3-бензенкарбоксамидом)], полученным с использованием 60% (вес./об.) стерильного раствора OptiPrep (Nucomed). Конкретно, 15 мл осветленного лизата переносили в центрифужную пробирку Quick-Seal Ultra-Clear 25×89 мм (Beckman) с помощью шприца, снабженного иглой 1/27×89 мм для спинномозговой пункции. Следует быть осторожными, во избежание пузырьков, которые могут мешать последующему заполнению и закупориванию пробирки. Перистальтический насос с различными скоростями, Model EP-1 (Bio-Rad), использовали для наслаивания в следующем порядке: 9 мл 15% йодиксанола и 1 М NaCl в буфере PBS-МК, содержащем феноловый красный (2,5 мкл 0,5% сток-раствора на 1 мл раствора йодиксанола); 5 мл 40% йодиксанола в буфере PBS-МК и, наконец, 5 мл 60% йодиксанола в буфере PBS-МК, содержащем феноловый красный (0,1 мкл/л). Пробирки закупоривали и центрифугировали на Ti-роторе типа 70 (Beckman) при 350000×g в течение 1 ч при 18°C. 4 мл прозрачного раствора на 40% ступени отсасывали, прокалывая пробирку сбоку шприцем, снабженным иглой 18 размера со скошенным концом. Фракцию йодиксанола дополнительно очищали методом обычной аффинной хроматографии на гепарин-агарозе.

Обычно для хроматографии предварительно набитую гепарин-агарозой 2,5-мл колонку типа I (Sigma) уравнивали под действием ее собственного веса 20 мл буфера PBS-МК. Затем фракцию йодиксанола гAAV наносили на предварительно уравновешенную колонку и затем колонку промывали 10 мл буфера PBS-МК. гAAV элюировали тем же самым буфером, содержащим 1 М NaCl. После нанесения элюионного буфера первые 2 мл элюента отбрасывали и вирус собирали в последующих 3,5 мл элюионного буфера.

Затем вирус концентрировали и обессоливали путем центрифугирования через фильтр BIOMAX® 100 K (Millipore, Bedford, MA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Буфер с высоким содержанием соли заменяли путем повторных разведений концентрированного вируса лактированным

раствором Рингера и воспроизведением титра как геном-содержащими частицами, так и инфекционными частицами гAAV. Для определения титра физических частиц использовали обычный дот-блот-анализ, количественный анализ конкурентной PCR (QC PCR) или более современный количественный анализ PCR в режиме реального времени (aRT-PCR) (Zolotukhin et al., 2002; Jacobson et al., 2006). Инфекционные титры определяются анализом инфекционных центров (ICA) и флуоресцентным клеточным анализом (FCA), который позволяет оценить экспрессию GFP (Zolotukhin et al., 2002).

Метод QC PCR основан на конкурентной ко-амплификации в реакционной пробирке специфической последовательности-мишени с плазмидой внутреннего стандарта известной концентрации. Он обеспечивает точное и быстрое количественное определение вирусных частиц. Внутренний стандарт должен иметь сайты распознавания праймера специфической матрицей. Как специфическая матрица, так и внутренний стандарт должны быть PCR-амплифицированы с одинаковой эффективностью, и должна быть обеспечена возможность анализировать PCR-амплифицированные продукты отдельно. Самым легким путем для того, чтобы проводить различие между матрицей и внутренним стандартом, является установление в указанных двух продуктах различий по размерам. Этого можно добиться, например, путем конструирования стандартов, имеющих одинаковую последовательность, в виде специфической мишени, но содержащей делецию. Затем предпринимается количественное определение путем сравнения сигнала PCR специфической матрицы со специфическим сигналом PCR, полученным с известной концентрацией конкурента (внутренний стандарт). Количественная PCR в режиме реального времени (qRT-PCR) является стандартным методом оценки концентрации ДНК неизвестного образца путем сравнения образования продукта PCR в режиме реального времени с известной стандартной ДНК.

Очищенный вирусный штамм сначала обрабатывают ДНКазой I для переваривания любой контаминирующей неупакованной ДНК. Десять из очищенных вирусных штаммов инкубировали 10 Ед. ДНКазы I (Boehringer, Ingelheim am Rhein, Germany) в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 1 ч при 37°C. В конце реакции добавляли 10 мкл 10× буфера для протеиназы К (10 мМ Tris-HCl [pH 8,0], 10 мМ ЭДТА, 1% ДСН в конечной концентрации) с последующим добавлением 1 мкл протеиназы К (18,6 мг/мл, Boehringer). Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Вирусную ДНК очищали путем хлороформ/фенольной экстракции (дважды) с последующей экстракцией хлороформом и этанольной преципитацией с использованием 10 мкг гликогена в качестве носителя. Осадок ДНК растворяли в 100 мкл воды. Каждая из реакционных смесей QC PCR содержала 1 мкл разбавленной вирусной ДНК и двукратные серийные разведения плазмидной ДНК внутреннего стандарта, такой как pdl-GFP. Было обнаружено, что наиболее достоверный разброс стандартной ДНК составляет от 1 до 100 пг. Затем аликвоты каждой из реакций изучали методом электрофореза в 2% агарозном геле, пока два этих продукта PCR не разделялись. Аналогичную картину геля, окрашенного бромидом этидия, отцифровывали с помощью системы ImageStore 7500 (UVP; Upland, CA, USA). Плотности полос мишени и конкурента в каждой дорожке измеряли с помощью системы анализа изображений ZERO-Dscan, версия 1.0 (Scanalytics, Rockville, MD, USA) и их отношение наносили в виде функции концентрации стандартной ДНК. Отношение, соответствующее 1,0, при котором число молекул вирусной ДНК равно числу молекул конкурентной ДНК, использовали для определения концентрации ДНК вирусного штамма.

Модификацию опубликованного ранее протокола (McLaughlin et al., 1988) использовали для определения способности вируса к инфицированию клеток C<sub>12</sub>, распаковке и репликации. Вкратце, клетки C<sub>2</sub>, содержащие интегрированные wtAAV rep- и cap-гены (Clark et al., 1995), помещали в 96-луночный планшет приблизительно при 75% конфлюентности, затем инфицировали Ad5 при М.О.И порядка 20. Одно из серийных разведений гAAV-sCNTF визуально оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа. Высокочувствительный фильтр CHROMA #41012 HighQ FITC LP (Chroma Technology, Bellows Fall, VA, USA) использовали для мониторинга флуоресценции. Для расчета титра путем гибридизации клетки собирали и обрабатывали в основном так, как было описано ранее (McLaughlin et al., 1988).

#### Фармацевтические композиции.

В определенных воплощениях настоящее изобретение относится к составам из одной или нескольких описанных здесь гAAV-гуанилатциклазных композиций в фармацевтически приемлемых растворах для введения в клетку или в организм животного, отдельно или в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими средствами.

Должно быть понятно также, что в случае необходимости композиции пептидилнуклеиновой кислоты (PNA), РНК, ДНК или сегмента нуклеиновой кислоты, которые экспрессируют продукт терапевтического гена, как здесь описано, могут быть введены в сочетании с другими средствами, такими, например, как белки или полипептиды, или различные фармацевтически активные средства, включая одно или несколько системных или местных введений гуанилатциклазных полипептидов. На самом деле фактически нет ограничений для других компонентов, которые также могут быть включены, при том условии, что указанные дополнительные средства не вызывают существенных нежелательных побочных эффектов при контакте с клетками-мишенями или тканями-хозяевами. гAAV-направленные гуанилатциклазные композиции могут, таким образом, быть доставлены вместе с разными другими средствами, если это необходимо в том или ином конкретном случае. Такие композиции могут быть очищены от клеток-

хозяев или других биологических источников или, альтернативно, могут, как здесь описано, быть синтезированы химическим путем. Сходным образом, такие композиции могут дополнительно содержать замещенные или дериватизированные композиции РНК, ДНК или ПНК.

Композиция растворов фармацевтически приемлемых эксципиентов и носителей хорошо известна специалистам в данной области, поскольку является разработкой подходящих режимов дозирования и схем лечения для применения описанных здесь конкретных композиций в различных схемах лечения, включая, например, пероральное, парентеральное, внутривенное, интраназальное, внутримышечное и прямое введение в одну или несколько клеток или типов тканей внутри организма животного, включая, например, глаз, сетчатку и субретинальную инъекцию и т.д.

Обычно указанные композиции могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% или более активного соединения, хотя и процент активного ингредиента (ингредиентов) может, конечно, быть изменен и обычно может составлять приблизительно от 1 или 2% и приблизительно до 60 или 70% или более от веса или объема всей композиции. Естественно, что количество активного соединения (соединений) в каждой терапевтически используемой композиции может быть получено таким образом, чтобы подходящая дозировка содержалась в любой конкретной лекарственной форме композиции. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, время полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические свойства, будут приниматься в расчет специалистами в области изготовления таких фармацевтических композиций, и, по существу, могут потребоваться разные дозы и схемы лечения.

При определенных обстоятельствах потребуется доставка описанных здесь фармацевтических композиций парентеральным путем, внутривенным, внутримышечным или даже, как описано, внутрибрюшинным путем (см., например, патенты США № 5543158; 5641515 и 5399363, каждый из которых специально и в полном объеме включен в настоящее описание в виде ссылки). Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть получены в воде, смешанной соответствующим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии могут быть получены также в глицерине, в жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При определенных условиях хранения и применения указанные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, подходящие для применения путем инъекций, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий (см., например, патент США № 5466468, специально и в полном объеме включенный в настоящее описание в виде ссылки). Во всех случаях такая лекарственная форма должна быть стерильной и должна быть в такой степени жидкой, чтобы легко набиралась в шприц. Она должна быть стабильна в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть раствор или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, и/или растительные масла. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, использованием покрытия, такого как лецитин, в случае дисперсии поддержанием требуемого размера частиц и применением поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно добиться различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимерозалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических средств, например сахаров или хлорида натрия. Пролонгированного всасывания инъеклируемых композиций можно добиться применением в композициях средств, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата и желатина алюминия.

Для парентерального введения в водном растворе, например, указанный раствор должен быть, если это необходимо, соответствующим образом забуферен, и жидкому растворителю сначала придают изотоничность достаточным количеством физиологического раствора или глюкозы. Конкретно, эти водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этой связи стерильная водная среда, которую можно использовать в свете настоящего описания, хорошо известна специалистам в данной области. Например, одна дозировка может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости гиподермоклаза, либо инъекцирована в соответствующий участок инфузии (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 15<sup>th</sup> Ed., p. 1035-1038 и 1570-1580). Определенные вариации в дозировке непременно возникнут, в зависимости от состояния субъекта, подвергаемого лечению. В любом случае определять подходящую дозу для того или иного субъекта будет лицо, отвечающее за назначение дозировки. Более того, для введения человеку препараты должны отвечать критериям стерильности, пирогенности и общей безопасности и стандартам чистоты, предъявляемым офисом биологических стандартов комиссии Соединенных Штатов Америки по контролю за лекарствами и питательными веществами (FDA).

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения активных соединений в требуемых количествах в соответствующий растворитель, в случае необходимости, с разными другими перечисленными здесь ингредиентами, с последующей стерилизацией способом фильтрования. Обычно дисперсии

получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами являются технологии вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые дают на выходе порошок из активного ингредиента плюс какого-нибудь дополнительного требуемого ингредиента из его предварительно отфильтрованного раствора.

Описанные здесь композиции могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли присоединения кислот (образованные со свободными аминоклассами белка) и соли, которые образованы с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислоты, или с такими органическими кислотами, как уксусная, оксалиновая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, могут быть получены также и из неорганических оснований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или гидроксиды железа, а также из таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. При составлении композиции растворы будут вводиться таким способом, который соответствует дозировке композиции, и в таком количестве, чтобы они были терапевтически эффективны. Указанные композиции легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, капсулы с высвобождающимся лекарственным средством и т.д.

Здесь "носитель" включает в себя любой и все растворители, диспергирующие среды, наполнители, вещества для покрывающего слоя, разбавители, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, задерживающие всасывание, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и средств для активных фармацевтических веществ хорошо известно специалистам в данной области. За исключением случаев, когда какая-нибудь обычно используемая среда или средство несовместимы с активным ингредиентом, их применение в терапевтических композициях является предусмотренным. В указанные композиции могут быть включены также и добавочные активные ингредиенты.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают аллергической или сходной с ней нежелательной реакции при введении человеку. Получение водной композиции, которая содержит белок в качестве активного ингредиента, хорошо известно в данной области. Обычно такие композиции получают в виде инъектируемых растворов или в виде жидких растворов или суспензий; могут быть получены также и твердые формы, предназначенные для растворения или суспендирования в жидкости перед инъектированием. Препарат может быть также эмульгирован.

Сравнение последовательностей, определение их идентичности и степени гомологии.

Для сравнения последовательностей и определения степени их гомологии обычно одну последовательность берут в качестве ссылочной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и ссылочную последовательности вводят в компьютер, если это необходимо, задают координаты подпоследовательности и устанавливают параметры программы алгоритма последовательности. Затем может быть использован алгоритм сравнения последовательностей для вычисления процента идентичности для тестируемой последовательности(ей) по отношению к ссылочной последовательности на основании установленных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть произведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии (см., например, Smith and Waterman, 1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания (см., например, Needleman and Wunsch, 1970), с помощью метода поиска сравнительного сходства (см., например, Pearson and Lipman, 1988), путем компьютеризированного ввода алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, в пакет компьютерного программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA или же путем визуального анализа. Одним из примеров алгоритма, который является подходящим для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST (Altschul et al., 1990) и оценочная матрица BLOSUM62 (см., например, Henikoff and Henikoff, 1989). Программным обеспечением для осуществления BLAST-анализов является информация, общедоступная через Национальный Центр Информации по Биотехнологии ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Помимо расчета процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, 1993). Другим полезным примером алгоритма выравнивания последовательностей является программа PILEUP, которая создает возможность выравнивания множества последовательностей из группы родственных последовательностей с помощью прогрессивного попарного выравнивания. Может быть также построено дерево с выделением кластеров с общими признаками родства, используемое для реализации выравнивания. В программе PILEUP используется упрощение сравнительного метода прогрессивного выравнивания (см., например, Feng and Doolittle, 1987) и используется матрица общего выравнивания, сходная с таковой, описанной Higgins and Sharp (1989).

Терапевтические и диагностические наборы.

Настоящее изобретение распространяется также на одну или несколько композиций совместно с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, носителями, разбавителями, адьювантами и/или другими компонентами, которые могут быть использованы в составлении конкретных гAAV-гуанилатциклязных композиций и в изготовлении терапевтических средств для введения млекопитающему, в частности человеку, при одном или нескольких состояниях дефицита гуанилатциклазы, таких как описанная здесь дистрофия сетчатки наподобие LCA1. В частности, такие наборы могут включать в себя одну или несколько гAAV-направленных гуанилатциклязных композиций в сочетании с инструкциями по применению вирусного вектора в лечении таких расстройств у млекопитающего и обычно могут дополнительно включать в себя контейнеры, изготовленные для создания удобной коммерческой упаковки.

Как таковые, описанные здесь предпочтительные для введения фармацевтических композиций животные включают в себя млекопитающих, в частности человека. Другие предпочтительные животные включают в себя всех приматов, кроме человека; мышей, зайчих, жвачных животных, лошадей, овец, козлов, волков, зайцев, лис, поросят, собак, кошек и т.д. Такая композиция может включать в себя частично или в значительной мере очищенные гAAV-гуанилатциклязные композиции, либо отдельно, либо в сочетании с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, которые могут быть получены из природных или рекомбинантных источников, или которые могут быть получены или природным путем или в результате химического синтеза, или же которые, альтернативно, могут быть получены *in vitro* из рекомбинантных клеток-хозяев, экспрессирующих сегменты ДНК, кодирующие такие дополнительные активные ингредиенты.

Могут быть получены также терапевтические наборы, которые содержат по меньшей мере одну из описанных здесь композиций, а также инструкции для применения указанной композиции в качестве терапевтического средства. Контейнерные устройства для таких наборов могут обычно включать в себя по меньшей мере одну ампулу, пробирку, флакон, бутылку, шприц или другие контейнерные устройства, в которые может быть помещена описанная здесь композиция (композиции) гAAV, и предпочтительно в подходящих кратных дозировках. При наличии второй гуанилатциклязной композиции такой набор может содержать также второе, отличающееся от первого, контейнерное устройство, в которое может быть помещена указанная вторая композиция. Альтернативно, может быть получен целый ряд гуанилатциклязных композиций в составе единой фармацевтической композиции, и она может быть упакована в одно контейнерное устройство, такое как ампула, флакон, шприц, бутылка, или другие подходящие единые контейнерные устройства. Наборы, предлагаемые в настоящем изобретении, обычно включают в себя устройства для помещения в них ампулы (ампул) в плотной защитной негерметичной оболочке для коммерческой продажи, такие, например, как инъекционные или литые пластиковые контейнеры, в которые помещают необходимую ампулу (ампулы).

Экспрессия в животных клетках.

Авторы настоящего изобретения считают, что полинуклеотид, содержащий непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид гуанилатциклазы согласно настоящему изобретению, может быть использован для лечения одного или нескольких клеточных дефектов в трансформированных клетках-хозяевах. Такими клетками предпочтительно являются животные клетки, включая клетки млекопитающих, например клетки, полученные из организма человека или любого примата, кроме человека, или из организма одного или нескольких видов, включая, без ограничения, мышинные, собачьи, бычьи, лошадиные клетки, клетки зайчих, кошачьих, овечьих, козлиных, волчьих, заячьих, свиные клетки и т.д. Применение таких конструкций для лечения и/или облегчения одного или нескольких симптомов дистрофии сетчатки, таких как LCA1 или родственного ему заболевания, расстройства, состояния или дисфункции сетчатки или глаза у человека, который предположительно страдает таким расстройством или у которого имеется определенный риск развития такого расстройства, считается авторами настоящего изобретения особенно эффективным.

Клетки могут быть трансформированы одним или несколькими векторами гAAV, содержащими один или несколько представляющих интерес терапевтических гуанилатциклязных генов, таких, чтобы генетических конструкций, встроенных и экспрессируемых в клетках-хозяевах указанного животного, было достаточно для изменения, уменьшения, облегчения или предотвращения губительного или болезненного состояния (состояний) или одного или нескольких его симптомов, будь то *ex vivo*, *in vitro*, *ex situ*, *in situ* и/или *in vivo*.

Гуанилат циклаза.

Гуанилатциклаза (GC) (EC 4.6.1.2) является лиазой, которая катализирует превращение гуанозинтрифосфатов (ГТФ) в 3',5'-циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) и пирофосфат. Что касается альтернативно упоминаемых в литературе "гуанилциклазы" или "гуанилилциклазы", то обе эти, мембраносвязанная (1 типа) и растворимая (2 типа), формы GC существуют.

Врожденный амавроз Лебера.

Врожденный амавроз Лебера (LCA) является аутомсомной рецессивной группой заболеваний, которые представляют собой наиболее раннюю и наиболее тяжелую форму из всех наследственных дистро-

фий сетчатки. Первый ген, участвующий в запуске указанного генетически и клинически гетерогенного заболевания и, следовательно, приписываемый локусу LCA1, является специфичной для сетчатки гуанилатциклазой-1 (*Gucy2d*) (Perrault et al., 1996). *Gucy2d* кодирует специфичный для сетчатки белок гуанилатциклазу (*retGC1*), который экспрессируется в основном в наружных сегментах мембран фоторецепторов и играет роль в регуляции уровней цГМФ и  $Ca^{2+}$  внутри указанных клеток. После световой стимуляции уровни цГМФ внутри наружных сегментов фоторецепторов быстро уменьшаются в силу гидролиза под действием фосфодиэстеразы цГМФ (PDE). Такое уменьшение уровней цГМФ приводит к закрытию цГМФ-воротных каналов, уменьшению притока  $Ca^{2+}$  и гиперполяризации клетки. Такое уменьшение уровней внутриклеточного  $Ca^{2+}$  стимулирует восстановление светочувствительных фоторецепторов до адаптировавшегося к темноте состояния путем их взаимодействия с белками, активирующими гуанилатциклазу (GCAP), семейством кальций-связывающих белков, которые регулируют активность гуанилатциклазы (GC). В адаптированном к темноте фоторецепторе  $Ca^{2+}$ -связанные белки GCAP ингибируют активность фермента GC. Однако при световой стимуляции свободные от  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -несвязанные) белки GCAP стимулируют активность фермента GC, которая вызывает повышение уровней цГМФ, раскрытие цГМФ-воротных каналов и возврат клетки в деполяризованное состояние. Предполагается, что мутации, которые уменьшают или упраздняют способность фермента GC восполнять внутриклеточный уровень цГМФ и повторное раскрытие цГМФ-воротных кальциевых каналов, что и имеет место при LCA1, создают биохимический эквивалент хронического воздействия света в палочковидных и колбочковидных фоторецепторах.

Мутации в *Gucy2d* насчитывают около 15% всех случаев LCA, что делает их лидирующей причиной данного заболевания. Число пациентов, пораженных LCA1, приблизительно вдвое больше, чем пораженных хорошо известной версией RPE65 данного заболевания (LCA2), формой, в отношении которой в настоящее время проводятся успешные клинические испытания AAV-опосредованной генной терапии, привлекающие внимание во всем мире. Диагноз LCA1 обычно устанавливают в течение нескольких первых месяцев жизни ребенка с полной слепотой или с очень ослабленным зрением, сильно стертой электроретнограммой (ERG) и маятникообразным нистагмом (Perrault et al., 1999; Chung and Traboulsi, 2009). Несмотря на подобный функциональный дефицит, у пациентов с LCA1 многие годы имеется нормальное дно (Perrault et al., 1999) и некоторое количество сохраненных палочковидных и колбочковидных фоторецепторов как в макулярной, так и в периферической зонах сетчатки (Milam et al., 2003; Simonelli et al., 2007; Pasadhika et al., 2009). С использованием оптической когерентной томографии спектральной области (SDOCT) для сканирования центральной макулярной и периферической областей в современных исследованиях было выявлено, что пациенты с LCA1 (в возрасте от 20 до 53 лет) имеют все 6 слоев сетчатки с пограничными соединениями внутренних/внешних сегментов зрительных фоторецепторов. Поддержание структуры сетчатки при LCA1 не похоже на другие формы заболевания, при которых имеет место значительное истончение сетчатки, которое с возрастом обычно ухудшается (Pasadhika et al., 2009). Поскольку сохранение структуры сетчатки одновременно не улучшает остроту зрения у пациентов с LCA1, считается, что им лучше следовать терапевтическим стратегиям будущего.

Животные модели.

Для оценки заместительной генной терапии были использованы две животные модели, несущие нулевые мутации в отношении гена *retGC1*, появляющегося природным путем цыпленка *GUCY1\*В* и мышь, нокаутную по гену гуанилатциклазы-1 (*GC1*) (см., например, Williams et al., 2006; Haire et al., 2006). Цыпленок *GUCY1\*В*, слепой с момента вылупления из яйца, отличается стертой скотопической (опосредованной палочками) и фотопической (опосредованной колбочками) картиной электроретнограммы (ERG) и дегенерацией сетчатки (см., например, Ulshafer et al., 1984; Huang et al., 1998; Semple-Rowland et al., 1998). Опосредованный лентивирусом перенос гена *Gucy2d* в сетчатку *GUCY1\*В* восстанавливал зрение указанным животным, что выявляется в результате их зрительно-поведенческого тестирования и ERG (см., например, Williams et al., 2006). Несмотря на кратковременный терапевтический эффект, указанной терапии не хватило для осуществления длительной защиты структуры или функции сетчатки. Транзитная природа такого результата, полученная на видах, не являющихся млекопитающими, с интегрированным вирусным вектором, доставленным *in ovo*, свидетельствует о том, что необходимы поиски более подходящей трансляции для разработки клинических подходов.

Модель LCA1 на млекопитающих, мышах *GC1KO*, отличается дегенерацией колбочковидных фоторецепторов (см., например, Yang et al., 1999; Coleman et al., 2004). Подобно пациентам с LCA1, потеря функции колбочек у такой мышинной модели предшествует дегенерации колбочек (Yang et al., 1999). Кроме того, у них нарушена индуцируемая светом транслокация аррестина колбочек. Палочковидные фоторецепторы у этой модели не подверглись дегенерации и продолжают вырабатывать электрическую реакцию на свет (Yang et al., 1999), результат, скорее всего, связанный с наличием в этих клетках GC2, близкородственной ферменту GC1 (см., например, Lowe et al., 1995; Yang et al., 1995; Yang and Garbers, 1997; Karan et al., 2010). AAV-опосредованный перенос *Gucy2d* на постнатальную сетчатку *GC1KO* восстанавливал световую транслокацию аррестина колбочек в преобразованных клетках, но его не хватало для восстановления ERG-реакций колбочек или предотвращения дегенерации колбочек (Haire et al., 2006). В обоих указанных исследованиях, и на цыпленке, и на мышах, которые были проведены одними и

теми же экспериментаторами, терапевтическая кДНК имела бычью природу, так как этот вид белков исторически используется в биохимических исследованиях по оценке функциональности GC1 (Otto-Bruc et al., 1997; Williams et al., 2006).

### Определения

Если специально не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно подразумевается под ними рядовыми специалистами в той области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при реализации или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и композиции, сходные с теми или эквивалентные тем, которые здесь описаны, в настоящем изобретении представлены предпочтительные способы и композиции. В связи с настоящим изобретением ниже приведены следующие термины и определения.

В соответствии с давно существующими патентными правилами, в настоящем документе, включая и формулу изобретения, при употреблении слов в единственном числе подразумевается также и множественное число, например "один или несколько".

Здесь термин "приблизительно" обычно должен пониматься как относящийся к обоим крайним числовым значениям, которыми обозначен числовой интервал значений. Например, "приблизительно от 1 до 10" следует понимать как "приблизительно 1 приблизительно до 10." Более того, здесь под всеми областями числовых значений следует понимать области, включающие в себя каждое из значений целых чисел внутри заданного интервала значений, а также каждую из их десятых долей. Под термином "приблизительно" здесь следует понимать "примерно" или "около", и обычно это относится к значениям, приблизительно равным конкретному числовому значению, указанному внутри интервала числовых значений. Кроме того, под всеми заданными областями числовых значений следует понимать области, включающие в себя каждое из значений целых чисел внутри указанного интервала значений.

В соответствии с настоящим изобретением полинуклеотиды, сегменты нуклеиновых кислот и т.п. включают в себя, но не ограничены, молекулы ДНК (включая, но не ограничиваясь, геномные или внегеномные ДНК), гены, пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК), РНК (включая, но не ограничиваясь, молекулы гРНК, мРНК и тРНК), нуклеозиды, а также соответствующие сегменты нуклеиновых кислот, которые либо получены из природных источников, либо синтезированы химическим путем, либо модифицированы, либо получены каким-нибудь другим способом, либо же полностью или частично синтезированы руками человека.

Здесь термин "нуклеиновая кислота" включает в себя один или несколько типов полидезоксирибонуклеотидов (содержащих 2-дезокси-D-рибозу), полирибонуклеотидов (содержащих D-рибозу), а также полинуклеотиды любого другого типа, которые являются N-гликозидом пуринового или пиримидинового основания, или же модифицированных пуриновых или пиримидиновых оснований (включая абазические sites). Здесь термин "нуклеиновая кислота" включает в себя полимеры рибонуклеозидов или дезоксирибонуклеозидов, которые ковалентно связаны обычно фосфодиэфирными связями между субъединицами, но в некоторых случаях фосфоротиоатами, метилфосфонатами и т.п. "Нуклеиновые кислоты" включают в себя одно- и двухцепочечные ДНК, так же как и одно- и двухцепочечные РНК. Иллюстративные нуклеиновые кислоты включают в себя, без ограничения, гДНК (gDNA); шпилечную РНК (hnRNA); мРНК; рРНК, тРНК, микро-РНК (миРНК), малые интерферирующие РНК (киРНК), малые ядерные РНК (мяРНК), малые ядерные РНК (мяРНК) и малую временную РНК (stРНК), и т.п., а также любую их комбинацию.

Здесь термин "сегмент ДНК" относится к молекуле ДНК, которая выделена в виде, свободном от суммарной геномной ДНК конкретного вида. Следовательно, сегмент ДНК, полученный из биологического образца с помощью описанных здесь композиций, относится к одному или нескольким сегментам ДНК, которые отделены от суммарной геномной ДНК конкретного вида, из которого они получены, или же очищены от нее. Включенными в термин "сегмент ДНК" являются сегменты ДНК и более мелкие фрагменты таких сегментов, а также рекомбинантные векторы, включая, например, плазмиды, космиды, фаги, вирусы и т.п.

Сходным образом, термин "сегмент РНК" относится к молекуле РНК, которая выделена в виде, свободном от суммарной геномной ДНК конкретного вида. Следовательно, сегменты РНК могут относиться к одному или нескольким сегментам РНК (либо нативной, либо синтетической природы), которые отделены от остальных молекул РНК или очищены от них. Включенными в термин "сегмент РНК" являются сегменты РНК и более мелкие фрагменты таких сегментов.

В контексте настоящего изобретения подразумевается, что термин "экспрессия" включает в себя сочетание внутриклеточных процессов, включая транскрипцию и трансляцию, претерпеваемую полинуклеотидом, таким как структурный ген, для синтеза кодируемого им пептида или полипептида.

Используемый здесь термин "например" используется в смысле "в качестве примера", не подразумевающая каких-либо ограничений, и не должен считаться относящимся только лишь к тем элементам, которые конкретно перечислены в данном описании.

Здесь термин "промотор" предназначен для того, чтобы в целом описать область или области последовательности нуклеиновой кислоты, которая осуществляет регуляцию транскрипции.

Здесь термин "регуляторный элемент" предназначен для того, чтобы в целом описать область или области последовательности нуклеиновой кислоты, которая осуществляет регуляцию транскрипции. Иллюстративные регуляторные элементы включают в себя, но не ограничены, энхансеры посттрансляционные элементы, последовательности, осуществляющие контроль транскрипции, и т.п.

Здесь термин "структурный ген" предназначен для того, чтобы в целом описать полинуклеотид, такой как ген, который экспрессируется для продуцирования кодируемого пептида, полипептида, белка, рибозима, каталитической молекулы РНК или антисмысловой молекулы.

Здесь термин "трансформация" предназначен для того, чтобы в целом описать процесс введения последовательности экзогенного полинуклеотида (например, вирусного вектора, плазмиды или молекулы рекомбинантной ДНК или РНК) в клетку-хозяина или протопласт, в которых указанный экзогенный полинуклеотид встроен по меньшей мере в первую хромосому или способен к автономной репликации внутри трансформированной клетки. Трансфекция, электропорация и поглощение "голой" нуклеиновой кислоты - все это относится к примерам технологий, используемых для трансформации клетки-хозяина одним или несколькими полинуклеотидами.

Здесь подразумевается, что термин "трансформированная клетка" означает клетку-хозяина, комплемент нуклеиновой кислоты которой изменен в результате введения в клетку одного или нескольких экзогенных полинуклеотидов.

Здесь под термином "трансгенная клетка" обычно подразумевается любая клетка, которая получена или восстановлена из трансформированной клетки или получена из другой трансгенной клетки, или из предшественницы или потомка любого поколения такой трансформированной или трансгенной клетки-хозяина.

Здесь под термином "вектор" обычно подразумевается молекула нуклеиновой кислоты (обычно содержащая ДНК), которая способна к репликации в клетке-хозяине и/или с которой может быть оперативно связан сегмент другой нуклеиновой кислоты, так, чтобы в общем осуществлялась репликация прикрепленного к ней сегмента. Плаزمиды, космиды или вирус представляют собой иллюстративные векторы.

Термины "по существу соответствуют", "по существу гомологичный" или "по существу идентичный" здесь относятся к характеристике нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, где выбранная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере приблизительно 70 или приблизительно 75%-ную идентичность последовательности выбранной ссылочной последовательности нуклеиновой кислоты или ссылочной аминокислотной последовательности. Чаще выбранная последовательность и ссылочная последовательность будут иметь по меньшей мере приблизительно 76, приблизительно 77, приблизительно 78, приблизительно 79, приблизительно 80, приблизительно 81, приблизительно 82, приблизительно 83, приблизительно 84 или даже приблизительно 85%-ную степень идентичности и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 86%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 87%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 88%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 89%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 90%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 91%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 92%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 93%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 94%-ную степень идентичности последовательностей или по меньшей мере приблизительно 95%-ную степень идентичности последовательностей или более высокую степень идентичности. Еще более предпочтительно, чтобы высокогомологичные последовательности часто имели бы более чем по меньшей мере приблизительно 96%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 97%-ную степень идентичности последовательностей, по меньшей мере приблизительно 98%-ную степень идентичности последовательностей или по меньшей мере приблизительно 99%-ную степень идентичности последовательностей между выбранной последовательностью и ссылочной последовательностью, с которой ее сравнивают. Процент, или степень, идентичности последовательностей может быть вычислен через полную длину сравниваемых последовательностей или же может быть вычислен путем исключения малых делеций или добавлений, которые в сумме составляют менее чем приблизительно 25 % или около того в выбранной ссылочной последовательности. Ссылочная последовательность может быть подпоследовательностью более крупной последовательности, такой как часть гена, или фланкирующая последовательность, или повторяющаяся часть хромосомы.

Однако в случае гомологии последовательностей между двумя или несколькими полинуклеотидными последовательностями ссылочная последовательность и последовательность-мишень обычно содержат по меньшей мере приблизительно от 18 примерно до 25 идентичных смежных нуклеотидов, чаще по меньшей мере приблизительно от 26 приблизительно до 35 смежных нуклеотидов, которые идентичны друг другу, и даже еще чаще, но по меньшей мере приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, или даже приблизительно 100 или около того смежных нуклеотидов, которые идентичны друг другу. Желательно, чтобы в случаях, когда

требуются высокомологичные фрагменты, степень общей идентичности последовательностей в процентах между двумя данными последовательностями составляла бы по меньшей мере приблизительно 80%-ную идентичность, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 85%-ную идентичность и более предпочтительно приблизительно 90%-ную идентичность, приблизительно 91%-ную идентичность, приблизительно 92%-ную идентичность, приблизительно 93%-ную идентичность, приблизительно 94%-ную идентичность или даже приблизительно 95%-ную или более высокую идентичность, которую легко определить с помощью одного или нескольких из алгоритмов сравнения последовательностей, хорошо известных специалистам в данной области, таких, например, как аналитическая программа FASTA, описанная Pearson и Lipman (1988).

Термины "идентичные" или процент "идентичности" в отношении двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые при сравнении и выравнивании на предмет максимального соответствия являются одинаковыми или которые имеют точно установленный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, что определяется с помощью какого-нибудь из описанных ниже алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (или других доступных рядовым специалистам в данной области алгоритмов), или же в результате визуального анализа.

Фраза "по существу идентичные" в отношении двух нуклеиновых кислот относится к двум или нескольким последовательностям или субпоследовательностям, которые имеют по меньшей мере приблизительно 90%-ную, предпочтительно, 91%-ную, наиболее предпочтительно, приблизительно 92%-ную, приблизительно 93%-ную, приблизительно 94%-ную, приблизительно 95%-ную, приблизительно 96%-ную, приблизительно 97%-ную, приблизительно 98%-ную, приблизительно 98,5%-ную, приблизительно 99%-ную, приблизительно 99,1%-ную, приблизительно 99,2%-ную, приблизительно 99,3%-ную, приблизительно 99,4%-ную, приблизительно 99,5%-ную, приблизительно 99,6%-ную, приблизительно 99,7%-ную, приблизительно 99,8%-ную или приблизительно 99,9%-ную или более высокую степень идентичности нуклеотидных остатков, при их сравнении и выравнивании на предмет максимального соответствия, что определяется с помощью алгоритма сравнения последовательностей или же в результате визуального анализа. Такие "по существу идентичные" последовательности обычно считаются "гомологичными" без ссылок на их истинные источники.

Здесь термин "образующиеся природным путем", используемый в отношении какого-нибудь объекта, относится к тому факту, что данный объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть отделена от ее природного источника и которая умышленно не модифицирована человеком вручную в лаборатории, является образующейся природным путем. Здесь лабораторные штаммы грызунов, которые могут быть селективно выведены в соответствии с классической генетикой, считаются возникающими природным путем животными.

Здесь "гетерологичный" определяется в отношении предварительно определяемой последовательности ссылочного гена. Например, в отношении последовательности структурного гена гетерологичный промотор определяется как промотор, который в природе не встречается расположенным рядом со ссылочным структурным геном, но который помещают туда в результате лабораторных манипуляций. Сходным образом, гетерологичный ген или сегмент нуклеиновой кислоты определяется как ген или сегмент, который в природе в смежном положении с элементами ссылочных промоторов и/или энхансеров не встречается.

Здесь термин "гомология" относится к степени комплементарности между двумя или несколькими полинуклеотидными или полипептидными последовательностями. Слово "идентичность" может заменить слово "гомология", если первая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность имеет в точности такую же первичную последовательность, что и последовательность второй нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности. Гомологичность последовательностей и идентичность последовательностей могут быть определены путем анализа двух или нескольких последовательностей с помощью алгоритмов и компьютерных программ, известных в данной области. Такие способы могут быть использованы для установления того, идентична ли или гомологична данная последовательность другой выбранной последовательности.

Здесь термин "гомологичные", если он используется в отношении полинуклеотидов, относится к последовательностям, которые имеют по существу такую же нуклеотидную последовательность, несмотря на то, что получены они из разных источников. Обычно гомологичные последовательности нуклеиновых кислот получают из близкородственных генов или организмов, содержащих одну или несколько по существу сходных геномных последовательностей. В отличие от этого, "аналогичный" полинуклеотид является таковым, который выполняет такую же функцию, будучи при этом полинуклеотидом из другого вида или организма, но может иметь существенные отличия в первичной нуклеотидной последовательности, которая кодирует один или несколько белков или полипептидов, которые выполняют сходные функции или обладают сходной биологической активностью. Аналогичные полинуклеотиды часто могут быть получены из двух или нескольких организмов, которые не являются близкородственными (например, либо генетически, либо филогенетически).

Здесь подразумевается, что термин "полипептид" охватывает "полипептид" в единственном числе, а также "полипептиды" в единственном числе, и указанный термин включает в себя любую цепь или цепи из двух или нескольких аминокислот. Таким образом, здесь термины, включая "пептид", "дипептид", "трипептид", "белок", "фермент", "аминокислотную цепь" и "непрерывную аминокислотную последовательность", но не ограничиваясь ими, все включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" может быть использован вместо - или взаимозаменяемым образом - с любым из указанных терминов. Указанный термин дополнительно включает в себя полипептиды, которые подвергаются одной модификации или нескольким посттрансляционным модификациям, включая, но не ограничиваясь ими, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию, протеолитическое расщепление, посттрансляционный процессинг, или модификациям путем включения одной или нескольких не образующихся в природе аминокислот.

В данной области для полинуклеотидных и полипептидных структур существует общепринятая номенклатура. Например, однобуквенные и трехбуквенные сокращения широко используются для описания аминокислот: аланин (A; Ala), аргинин (R; Arg), аспарагин (N; Asn), аспарагиновая кислота (D; Asp), цистеин (C; Cys), глутамин (Q; Gln), глутаминовая кислота (E; Glu), глицин (G; Gly), гистидин (H; His), изолейцин (I; Ile), лейцин (L; Leu), метионин (M; Met), фенилаланин (F; Phe), пролин (P; Pro), серин (S; Ser), треонин (T; Thr), триптофан (W; Trp), тирозин (Y; Tyr), валин (V; Val) и лизин (K; Lys). Описанные здесь аминокислотные остатки являются предпочтительными в форме их "L"-изомера. Однако остатки в форме "D"-изомера могут быть использованы вместо любого L-аминокислотного остатка при условии, что требуемые свойства данного полипептида сохраняются.

Здесь термин "белок", или "протеин", используется взаимозаменяемым образом с "пептидом" и "полипептидом" и включает в себя как пептиды, так и полипептиды, продуцируемые синтетическим, рекомбинантным путем или продуцируемые *in vitro*, а также пептиды и полипептиды, экспрессируемые *in vivo* после того, как последовательности нуклеиновых кислот вводят в организм животного-хозяина или в организм человека.

Термин "полипептид" предпочтительно используется в отношении аминокислотных цепей любой длины, включая цепи коротких пептидов приблизительно от 2 примерно до 20 аминокислотных остатков в длину, олигопептидов приблизительно от 10 примерно до 100 аминокислотных остатков в длину и полипептидов приблизительно от 100 примерно до 5000 или более аминокислотных остатков в длину.

Термин "последовательность" в применении к аминокислотам относится ко всем или к части аминокислот, расположенных в линейном порядке от N-конца до C-конца, внутри данной аминокислотной цепи, например в полипептиде или белке; "подпоследовательность" означает любой отрезок идущих подряд аминокислот внутри последовательности, например по меньшей мере из трех последовательных аминокислот внутри данной белковой или полипептидной последовательности. В отношении нуклеотидных и полинуклеотидных цепей "последовательность" и "подпоследовательность" имеют сходные значения, относящиеся к порядку нуклеотидов от 5'-к 3'-концу.

Здесь термин "по существу гомологичные" охватывает две или несколько последовательностей биологических молекул, которые по существу подобны друг другу на уровне первичной последовательности нуклеотидов. Например, в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот "по существу гомологичные" может относиться по меньшей мере приблизительно к 75%-ной, предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 80%-ной и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 85%-ной или по меньшей мере приблизительно к 90%-ной идентичности и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 95%-ной, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 97%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 98%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно к 99%-ной идентичности и даже еще более предпочтительно к полной идентичности (т.е. к их 100%-ной идентичности или к их "инвариантности").

Сходным образом, термин "по существу идентичные" охватывает здесь две или несколько последовательностей биологических молекул (и, в частности, полинуклеотидных последовательностей), которые на нуклеотидном уровне имеют высокую степень идентичности по отношению друг к другу. Например, в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот "по существу идентичные" может относиться к последовательностям, которые по меньшей мере приблизительно на 80% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 85% или по меньшей мере приблизительно на 90% идентичны друг другу и даже еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 97% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентичны и даже еще более предпочтительно полностью идентичны (т.е. идентичные на 100%, или "невырожденные").

Термин "рекомбинантный" указывает на то, что материал (например, полинуклеотид или полипептид) искусственно или синтетически (неприродным образом) изменен в результате вмешательства человека. Указанное вмешательство может быть осуществлено на таком материале в его природном окружении или состоянии или же когда он изъят из его природного окружения. В частности, например, после-

довательность промотора является "рекомбинантной", если она продуцируется путем экспрессии сегмента нуклеиновой кислоты, сконструированного рукой человека. Например, "рекомбинантная нуклеиновая кислота" является таковой, которая создана путем рекомбинации нуклеиновых кислот, например, в процессе клонирования, перетасовки ДНК или других процедур или путем химического или иных типов мутагенеза; "рекомбинантный полипептид" или "рекомбинантный белок" является полипептидом или белком, который продуцируется в результате экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты; и "рекомбинантный вирус", например рекомбинантный вирус AAV, продуцируется в результате экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Здесь термин "оперативно связанный" относится к связи двух или нескольких полинуклеотидов или двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот в функциональном взаимоотношении. Нуклеиновая кислота является "оперативно связанной", когда она находится в функциональном взаимоотношении с последовательностью другой нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер является оперативно связанным с кодирующей последовательностью, если он действует на транскрипцию кодирующей последовательности. "Оперативно связанный" означает, что последовательности нуклеиновых кислот, являясь связанными, обычно являются примыкающими друг к другу или по существу смежными, и, если необходимо соединить две кодирующие последовательности белков, они являются примыкающими друг к другу в рамке считывания. Поскольку энхансеры обычно функционируют, когда отделены от промотора несколькими тысячами оснований и интронными последовательностями, которые могут быть разной длины, так и некоторые полинуклеотидные элементы могут быть оперативно связаны, но не быть смежными.

"Транскрипционный регуляторный элемент" относится к полинуклеотидной последовательности, которая активирует транскрипцию, отдельно или в сочетании с одной или несколькими другими последовательностями нуклеиновых кислот.

Транскрипционный регуляторный элемент может, например, содержать один или несколько промоторов, один или несколько элементов отклика, один или несколько негативных регуляторных элементов и/или один или несколько энхансеров.

Здесь "сайт узнавания фактора транскрипции" и "сайт связывания фактора транскрипции" относятся к полинуклеотидной последовательности(ям) или последовательности мотив(ов), которые идентифицированы как сайты взаимодействия специфических последовательностей одного или нескольких факторов транскрипции, часто принимающих форму прямого связывания ДНК-белок. Обычно сайты связывания фактора транскрипции могут быть идентифицированы методом футпринтинга ДНК, анализом по сдвигу пятна в геле и т.п. и/или могут быть предсказаны на основе известных мотивов консенсусных последовательностей или же другими способами, известными специалистам в данной области.

"Единица транскрипции" относится к полинуклеотидной последовательности, которая содержит по меньшей мере первый структурный ген, оперативно связанный по меньшей мере с первой cis-действующей промоторной последовательностью и необязательно оперативно связанный с одной или несколькими другими cis-действующими последовательностями нуклеиновых кислот, необходимыми для эффективной транскрипции последовательности структурного гена, и по меньшей мере первый дистальный регуляторный элемент, что может оказаться необходимым для соответствующей тканеспецифической и развивающейся транскрипции последовательности структурного гена, оперативно расположенной под контролем элементов промотора и/или энхансера, а также любые дополнительные cis-последовательности, которые необходимы для эффективной транскрипции и трансляции (например, сайт (сайты) полиаденилирования, последовательность (последовательности), контролирующая стабильность мРНК, и т.п.

Термин "по существу комплементарный", когда его используют для определения либо аминокислотных последовательностей, либо последовательностей нуклеиновых кислот, означает, что последовательность конкретного объекта, например олигонуклеотидная последовательность, является по существу комплементарной всей или части выбранной последовательности и, таким образом, будет специфически связываться с частью мРНК, кодирующей указанную выбранную последовательность. Обычно указанные последовательности как таковые будут высококомплементарны последовательности-мишени мРНК и будут иметь не более чем приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9 или приблизительно 10 или около того ошибочно спаренных оснований на протяжении комплементарной части последовательности. Во многих случаях может быть желательным, чтобы последовательности в точности совпадали, т.е. были бы полностью комплементарны той последовательности, с которой указанный олигонуклеотид специфически связывается, а следовательно, имеет ноль ошибочно спаренных оснований на протяжении комплементарного отрезка. Как таковые высококомплементарные последовательности будут обычно очень специфически связываться с областью последовательности-мишени мРНК и будут, следовательно, высокоэффективными в ослаблении и/или даже ингибировании трансляции последовательности-мишени мРНК в полипептидном продукте.

Существенная комплементарность последовательностей нуклеиновых кислот будет составлять более чем приблизительно 80%-ную комплементарность (или "% точных совпадений") соответствующей

последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, с которой указанная нуклеиновая кислота специфически связывается, и более предпочтительно будет составлять более чем приблизительно 85%-ную комплементарность соответствующей последовательности-мишени, с которой указанная нуклеиновая кислота специфически связывается. В определенных аспектах, как описано выше, было бы желательно иметь даже более существенно комплементарные последовательности нуклеиновых кислот для применения при реализации настоящего изобретения, и в таких случаях последовательности нуклеиновых кислот будут приблизительно более чем на 90% комплементарны соответствующей последовательности-мишени, с которой указанная нуклеиновая кислота специфически связывается, и могут в определенных воплощениях быть выше чем приблизительно на 95% комплементарны соответствующей последовательности-мишени, с которой указанная нуклеиновая кислота специфически связывается, и даже вплоть до и включая приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% и даже приблизительно 100% точных совпадений, комплементарных всей или части последовательности-мишени, с которой указанная сконструированная нуклеиновая кислота специфически связывается. Процент сходства или процент комплементарности любой из описанных последовательностей нуклеиновых кислот может быть определен, например, путем сравнения информации о последовательностях с помощью компьютерной программы GAP, версия 6.0, доступной из Генетической Компьютерной Группы Университета в Висконсине (UWGCG). В программе GAP используется способ выравнивания Needleman и Wunsch (1970). Вкратце, в программе GAP сходство определяется как число выровненных символов (т.е. нуклеотидов или аминокислот), которые являются сходными, деленное на общее число символов в более короткой из двух указанных последовательностей.

Предпочтительные для программы GAP параметры по умолчанию включают в себя (1) унарную матрицу сравнения (содержащую значение 1 в случае идентичности и 0 в случае не идентичности) для нуклеотидов и матрицы сравнения Gribkov и Burgess (1986), (2) штраф 3.0 за каждый гэп и дополнительный штраф 0.10 за каждый символ в каждом гэпе и (3) отсутствие штрафа за концевые гэпы.

Здесь термины "белок", "полипептид" и "пептид" используются взаимозаменяемым образом и включают в себя молекулы, которые включают в себя по меньшей мере одну амидную связь, соединяющую два или несколько аминокислотных остатка друг с другом. Несмотря на то, что указанные термины используются взаимозаменяемым образом, обычно пептид является относительно короткой молекулой (например, от 2 приблизительно до 100 аминокислотных остатков в длину), тогда как белок или полипептид являются относительно более длинным полимером (например, 100 или более остатков в длину). Тем не менее, если специально длина цепи не указана, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемым образом.

Здесь термин "пациент" (также используемый взаимозаменяемым образом с терминами "хозяин" или "субъект") относится к любому хозяину, который, как обсуждается в настоящем документе, может служить в качестве реципиента одной или нескольких из гуанилатциклазных композиций на основе гAAV. В определенных аспектах указанным реципиентом будет позвоночное животное, под которым подразумевается животное любого вида (предпочтительно вида млекопитающих, такого, каким является человек). В определенных воплощениях термин "пациент" относится к любому животному-хозяину, включая, но не ограничиваясь ими, человека и всех приматов, кроме человека; жвачных животных, собак, козлов, кур, ворон, зайцев, лошадей, кошек, кроликов, зайцев, волков, мышей, овец, поросят, гасинов, лис, и т.п., включая, без ограничения, одомашненных животных, стадных или кочующих животных, экзотических или зоологических видов, а также домашних животных, питомцев, а также любых животных, находящихся под надзором ветеринарного врача.

Здесь под термином "носитель" подразумевается любой растворитель(и), диспергирующая среда, вещество(а) для покрывающего слоя, разбавитель(и), буфер(ы), изотоническое(ие) средство(а), раствор(ы), суспензия(и), коллоид(ы), инертные составляющие или пр. или их сочетание, которое является фармацевтически приемлемым для введения соответствующему животному или в зависимости от обстоятельств приемлемым для диагностических целей. Применение одного или нескольких средств доставки конструкций для генной терапии, вирусных частиц, векторов и т.п. хорошо известно рядовым специалистам в области фармацевтики и конструирования молекул. За исключением случаев, когда какая-нибудь обычно используемая среда или средство не совместимы с активным ингредиентом, их применение в профилактических и/или терапевтических композициях является предусмотренным. Один или несколько добавочных активных ингредиентов могут также быть включены в указанные композиции или могут вводиться совместно с одной или несколькими из описанных композиций.

Здесь под "эффективным количеством" специалистам в данной области следует понимать такое количество, которое обеспечивает терапевтический, профилактический или иной какой-нибудь благотворный эффект, оказываемый на пациента-реципиента.

Фразы "изолированный" или "биологически чистый" относятся к материалу, который является существенно или по существу свободным от компонентов, которые в норме сопровождают указанный материал, если он находится в своем нативном состоянии. Таким образом, предпочтительно, чтобы изолированные полинуклеотиды согласно настоящему изобретению не содержали материалов, которые в норме ассоциированы с указанными полинуклеотидами в их природном или *in situ* окружении.

"Связывание" или "присоединение" относится к любому способу, известному в данной области, для функционального связывания одного или нескольких белков, пептидов, нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, включая, без ограничения, рекомбинантное слияние, ковалентное связывание, дисульфидное связывание, ионное связывание, водородное связывание, электростатическое связывание и т.п.

Здесь термин "плазмида" или "вектор" относится к генетической конструкции, которая составлена из генетического материала (т.е. нуклеиновых кислот). Обычно плазмида или вектор содержит ориджин репликации, который является функциональным в бактериальных клетках-хозяевах, например в *Escherichia coli*, и селективные маркеры для детектирования бактериальных клеток-хозяев, включая плазмиду. Плазмиды и векторы согласно настоящему изобретению могут включать в себя один или несколько генетических элементов, расположенных, как здесь описано, в определенном порядке, так, чтобы встроенная кодирующая последовательность могла быть транскрибирована и транслирована в соответствующих экспрессирующих клетках. Кроме того, плазмида или вектор могут включать в себя один или несколько сегментов нуклеиновых кислот, генов, промоторов, энхансеров, активаторов, множественных сайтов клонирования или любое их сочетание, включая сегменты, которые получены из или изъятые из одного или нескольких природных и/или искусственных источников.

Термин "последовательность, по существу такая, какая представлена в SEQ ID NO: X" означает, что указанная последовательность в основном соответствует части SEQ ID NO: X и имеет относительно небольшое число нуклеотидов (или же аминокислотных остатков в случае полипептидных последовательностей), которые не идентичны нуклеотидам (или аминокислотам) или их биологически функциональному эквиваленту последовательности SEQ ID NO: X. Термин "биологически функциональный эквивалент" хорошо известен в данной области и в дальнейшем будет подробно здесь охарактеризован.

Соответственно, последовательности, которые имеют приблизительно от 85 до примерно 90%; или более предпочтительно приблизительно от 91 до примерно 95%; или еще более предпочтительно приблизительно от 96 до примерно 99% нуклеотидов, которые являются идентичными или функционально эквивалентными одной или нескольким из представленных здесь нуклеотидных последовательностей, считаются особенно полезными в реализации настоящего изобретения.

Подходящие для настоящего изобретения стандартные условия гибридизации включают в себя, например, гибридизацию в 50% формамиде, 5× растворе Денхардта, 5× SSC (раствор цитрата и хлорида натрия), 25 мМ фосфате натрия, 0,1% ДСН и 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося при 42°C в течение 16 ч с последующими промываниями в течение 1 ч раствором 0,1× SSC, 0,1% ДСН при 60°C для удаления требуемого количества фонового сигнала. Менее жесткие условия гибридизации для настоящего изобретения включают в себя, например, гибридизацию в 35% формамиде, 5× растворе Денхардта, 5× SSC, 25 мМ фосфате натрия, 0,1% ДСН и 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося или ДНК *E.coli* при 42°C в течение 16 ч с последующими промываниями 0,8× SSC, 0,1% ДСН при 55°C. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что условия могут быть легко подогнаны для достижения требуемого уровня жесткости.

Естественно, настоящее изобретение охватывает также сегменты нуклеиновых кислот, которые являются комплементарными, по существу комплементарными и/или существенно комплементарными по меньшей мере одной или нескольким из специфических нуклеотидных последовательностей, специально здесь представленных. Последовательности нуклеиновых кислот, которые являются "комплементарными", представляют собой такие последовательности, которые способны к спариванию основаниями, в соответствии со стандартными правилами комплементарности по Уотсону-Крику. Здесь термин "комплементарные последовательности" означает последовательности нуклеиновых кислот, которые существенно комплементарны, что может быть установлено путем такого же сравнения нуклеотидов, какое описано выше, или же так, как определено в связи со способностью гибридизоваться с одним или несколькими из описанных здесь специфических сегментов нуклеиновых кислот в относительно жестких условиях, таких как те, что описаны непосредственно выше.

Как описано выше, зонды и праймеры согласно настоящему изобретению могут иметь любую длину. Приписывая числовые значения последовательности, например, первому остатку 1, второму остатку 2 и т.д., можно предложить алгоритм, определяющий все зонды или праймеры, содержащиеся в данной последовательности: от  $n$  до  $n+u$ , где  $n$  является целым числом от 1 до последнего номера последовательности,  $u$  представляет собой длину зонда или праймера минус единица,  $n+u$  не превышает числа, соответствующего последнему номеру данной последовательности. Таким образом, для зонда или праймера из 25-пар оснований (т.е. "25-мерного", или "25-mer") набор зондов или праймеров соответствует основаниям от 1 до 25, основаниям от 2 до 26, основаниям от 3 до 27, основаниям от 4 до 28 и т.д. по всей длине указанной последовательности. Сходным образом, для зонда или праймера из 35-пар оснований (т.е. "35-мерного", или "35-mer") иллюстративные последовательности праймера или зонда включают в себя, без ограничения, последовательности, соответствующие основаниям от 1 до 35, основаниям от 2 до 36, основаниям от 3 до 37, основаниям от 4 до 38 и т.д. по всей длине указанной последовательности. Сходным образом, в случае 40-мерных зондов или праймеров последние могут соответствовать нуклеотидам от первой пары нуклеотидов до 40 п.н., от второй п.н. указанной последовательности до 41

п.н., от третьей п.н. до 42 п.н. и т.д., тогда как для 50-мерных зондов или праймеров последние могут соответствовать нуклеотидной последовательности, распространяющейся от 1 до 50 п.н., от 2 до 51 п.н., от 3 до 52 п.н., от 4 до 53 п.н. и т.д.

В определенных воплощениях выгоднее будет использовать один или несколько сегментов нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению в сочетании с соответствующим детектируемым маркером (т.е. "меткой"), таким как в случае использования меченых полинуклеотидных зондов при определении наличия данной последовательности-мишени при анализе гибридизации. Широкое разнообразие соответствующих индикаторных соединений и композиций известно в данной области для мечения олигонуклеотидных зондов, включая, без ограничения, флуоресцентные, радиоактивные, ферментативные или другие лиганды, такие как авидин/биотин и т.п., которые могут быть обнаружены в соответствующем анализе. В конкретных воплощениях можно использовать также одну или несколько флуоресцентных меток или ферментативную метку, такую как уреаза, щелочная фосфатаза или пероксидаза, вместо радиоактивных или других, менее желательных в отношении окружающей среды реагентов. В случае ферментативных меток известны колориметрические, хромогенные или флуорогенные индикаторные субстраты, которые могут быть использованы для обеспечения способа детектирования образца, который становится видимым для человеческого глаза, или с помощью аналитических методов, таких как сцинтиграфия, флуориметрия, спектрофотометрия, и т.п., для идентификации специфической гибридизации с образцами, содержащими одну или несколько комплементарных или по существу комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот. В случае так называемых "мультиплексных" анализов, когда одновременно или последовательно детектируют два или несколько меченых зонда, может оказаться желательным пометить первый олигонуклеотидный зонд первой меткой, имеющей первое свойство или параметр детектирования (например, максимум спектра эмиссии и/или возбуждения), которой помечен также и второй олигонуклеотидный зонд, меченный второй меткой, имеющей второе свойство или параметр детектирования, который является другим (т.е. отличается от таковых первой метки). Применение мультиплексных анализов, в частности, в контексте протоколов генетической амплификации/детектирования хорошо известно рядовым специалистам в области молекулярной генетики.

#### Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных воплощений настоящего изобретения.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что технологии, описанные в последующих примерах, представляют собой технологии, раскрытые автором для лучшей реализации настоящего изобретения на практике, и, таким образом, можно считать, что они составляют предпочтительные варианты его реализации. Однако специалистам в данной области должно быть очевидно, в свете настоящего описания, и то, что в описанные специфические воплощения могут быть внесены многие изменения, и при этом будут получены сходные или подобные результаты, не выходящие за рамки концепции и объема правоприменения настоящего изобретения.

Пример 1. AAV-опосредованная генная терапия способствует сохранению зрительной функции и зрительно-реактивному поведению у мышиной модели LCA1.

В данном примере авторы настоящего изобретения оценивали то, может ли доставка видоспецифической (т.е. мышиной) версии *retGC1* к колбочковидным клеткам постнатальных мышей GC1KO восстановить функцию указанных клеток. Векторы AAV серотипа 5 были использованы для доставки *mGC1* к фоторецепторам мышей GC1KO в постнатальный день 14 (P14). Электроретинограмму (ERG) и зрительно-поведенческое тестирование использовали для установления зрительной функции, а иммуноцитохимический анализ использовали для проверки экспрессии терапевтического трансгена, локализации аррестина в колбочках и плотности колбочковидных фоторецепторов в обработанных и не подвергнутых обработке глазах.

В данном примере показано, что вектор AAV, субретинально доставленный в один глаз мышей P14 GC1KO, облегчает экспрессию *retGC1* дикого типа, восстановление зрительной функции и поведения, а также защиту колбочковидных фоторецепторов. Через четыре недели после инъекции зрительную функцию (ERG) изучали в обработанных и в не подвергнутых обработке глазах. После этого ERG предпринимали каждые две недели, до 3-месячного срока после инъекции (последняя временная точка, в которой проводилась оценка). Мышей с положительной реакцией ERG, а также изогенных мышей дикого типа и не подвергнутых обработке контрольных мышей оценивали на предмет восстановления зрительного поведения путем тестирования оптокинетического рефлекса. В 3-месячный срок после инъекции всех животных забивали и их обработанные и необработанные сетчатки оценивали на предмет экспрессии GC1 и локализации аррестина колбочек.

Полученные результаты подтвердили также, что опосредованная колбочками функция восстанавливалась в обработанных глазах мышей GC1KO (амплитуды ERG составляли ~60% от нормальных). Более того, эффект обработки был стабильным по меньшей мере в течение 3 месяцев после введения. Тестирование поведения выявило устойчивое улучшение в опосредованном колбочками зрительном поведении, с реакциями у обработанных мышей, сходными или идентичными таковым у мышей дикого типа. Гистологически выявлена AAV-опосредованная экспрессия GC1 в фоторецепторах и восстановление

транслокации аррестина колбочек у обработанных мышей. Кроме того, плотность колбочковидных клеток была выше в обработанных глазах, чем в контралатеральных контрольных глазах. Такой результат предполагает, что обработка способна защитить колбочковидные фоторецепторы по меньшей мере в течение трех месяцев после обработки. Это является первой демонстрацией того, что постнатальная генная терапия способна восстанавливать зрительную функцию и поведение и защищать структуру сетчатки у млекопитающих животных-моделей LCA1. Что важно, результаты были получены с использованием хорошо охарактеризованного, клинически релевантного вектора AAV; данные, полученные таким образом на животной модели *in vivo*, служат фундаментом для применения генной терапии на основе вектора AAV для лечения детей, пораженных LCA1.

Материалы и методы.

Экспериментальные животные.

Гетерозиготные эмбрионы GC1<sup>+/-</sup> получали из фонда криоконсервирования из Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Гетерозигот спаривали в условиях, обеспечиваемых авторами настоящего изобретения, с получением потомства GC1KO (-/-) и изогенных контрольных +/+ животных. Все мыши были скрещены в централизованных условиях в институте авторов настоящего изобретения при 12-часовом цикле смены света/темноты. Пищу и воду животным предоставляли в неограниченном количестве. Все исследования на животных были поддержаны местным Комитетом по биоэтике и проводились в соответствии с утвержденными правилами ARVO по использованию животных в офтальмологических испытаниях по изучению зрительной функции и в соответствии с правилами NIH.

Конструирование векторов AAV.

Векторы аденоассоциированного вируса (AAV5) серотипа 5 были использованы для доставки мышинной GC1 (mGC1), поскольку было показано, что они обеспечивают устойчивую эффективность трансдукции и более ранний запуск их экспрессии в фоторецепторах сетчатки, чем векторы AAV других серотипов (Yang et al., 2002). Как клеточно-специфический, так и убиквитарный промоторы были выбраны для осуществления экспрессии mGC1. Промотор клеточно-специфической связанной с G-белком рецепторной киназы 1 (GRK1), известный также как промотор родопсин-киназы, был выбран, в силу его способности специфически нацеливать устойчивую экспрессию трансгена в палочковидных и колбочковидных фоторецепторах при его использовании в сочетании с AAV (Khani et al., 2007). Убиквитарный промотор smCBA, который отличается картиной экспрессии в сетчатке, сходной с таковой, осуществляемой полноразмерным CBA, был выбран в силу его способности эффективного нацеливания на нейральную сетчатку (Haïre et al., 2006). В полимеразной цепной реакции использовали

следующий прямой праймер:

5'-AAAAGCGGCCGATGAGCGCTTGGCTCCTGCCAGCC-3' (SEQ ID NO: 14)

и следующий обратный праймер:

5'-AAAAGCGGCCGCTCACTTCCCAGTAACTGGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 15),

которые были использованы для амплификации mGC1 из плазмиды, содержащей слияние mGC1-eGFP (Bhowmick et al., 2009). Полученный в результате фрагмент клонировали в плазмиду pCRblunt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) и выверяли последовательность. AAV-векторная плаزمиды, содержащая smCBA, направляющий экспрессию mGC1 (pTR-smCBA-mGC1), была создана путем замены полноразмерного CBA на smCBA в плазмиде pTR-CB<sup>SB</sup>-hRPE65 (Jacobson et al., 2006) путем расщепления под действием EcoRI и последующего лигирования. Впоследствии hRPE65 был заменен на mGC1 путем расщепления под действием NotI и лигирования, что в результате привело к созданию pTR-smCBA-mGC1 (фиг. 11). AAV-векторная плазмиды, содержащая человеческий промотор GRK1, направляющий экспрессию mGC1, pTR-GRK1-mGC1, была создана путем удаления hGFP из pTR-hGRK1-hGFP (Beltran et al., 2010) и замены ее на mGC1 путем расщепления под действием NotI и лигирования (фиг. 11). Векторы AAV были упакованы в соответствии с ранее опубликованными методами (Haïre et al., 2006). Вирусные частицы ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе (Alcon, Fort Worth, TX, USA) и титровали, используя количественную PCR в режиме реального времени (Jacobson et al., 2006). Полученные в результате титры составляли  $4,69 \times 10^{12}$  вирусных геномов на 1 мл (вг/мл) и  $4,12 \times 10^{13}$  вг/мл для AAV5-smCBA-mGC1 и AAV5-hGRK1-mGC1 соответственно.

Субретинальные инъекции.

1 мкл AAV5-GRK1-mGC1 ( $4,12 \times 10^{10}$  доставленных векторных геномов) или AAV5-smCBA-mGC1 ( $4,69 \times 10^9$  доставленных векторных геномов) доставляли субретинально в постнатальный день 14 (P14) в правый глаз каждой мыши GC1KO, оставляя левый глаз в качестве контралатерального контроля. Субретинальные инъекции производили так, как описано выше (Timmers et al., 2001; Pang et al., 2006). Дальнейшие анализы проводили только у тех животных, которые получили сравнимые, успешные инъекции (>60% отслоения сетчатки и минимальные осложнения). Надежно установлено, что область отслоения сетчатки соответствует вирусной трансдукции (Cideciyan et al., 2008; Timmers et al., 2001).

Электроретинографические анализы.

Электроретинограммы (ERG) обработанных GC1KO (n=14) и изогенных контролей +/+ (n=2) регистрировали, используя контроль на основе РС и регистрирующий элемент (Toennies Multiliner Vision;

Jaeger/Toennies, Hochberg, Germany), согласно ранее описанным способам, с незначительными модификациями (Haire et al., 2006). Начальные измерения ERG проводили через 4 недели после инъекции, а затем каждые 2 недели, до наступления 3-месячного срока после инъекции (последняя временная точка, оцениваемая в данном исследовании). Соответствующие по возрасту изогенные контроли +/- изучали в дополнение к обработанным животным в каждой временной точке. Мышей адаптировали к темноте (более чем в течение 12 ч) и анестезировали смесью из 100 мг/кг кетамина, 20 мг/кг ксилазина и физиологического раствора в соотношении 1:1:5 соответственно. Зрачки расширяли, используя 1% тропикамид и 2,5% фенилэфрина гидрохлорид. Нагретую циркулирующую водяную баню использовали для поддержания температуры тела при 38°C. Гидроксипропилметилцеллюлозу 2,5% накладывали на каждый глаз для предотвращения дегидратации сетчатки. ERG в полном поле регистрировали, используя традиционные петельные сетчаточные электроды из золотой (платиновой) проволоки. Ссылочные и основные электроды размещали подкожно между глазами и в хвосте соответственно. Скотопические реакции палочек регистрировали в серии из семи белых вспышек с возрастающей интенсивностью (от 0,01 мкд-ср/м<sup>2</sup> до 5 кд-ср/м<sup>2</sup>). Интервалы между стимулами, в случае стимулов низкой интенсивности, составляли 1,1 с. В случае трех стимулов самой высокой интенсивности (100 мкд-ср/м<sup>2</sup>, 1 кд-ср/м<sup>2</sup> и 5 кд-ср/м<sup>2</sup>) интервалы между стимулами составляли 2,5, 5,0 и 20,0 с соответственно. Было зарегистрировано 10 ответных реакций, которые усредняли для каждой интенсивности. Затем мышей адаптировали к свету с интенсивностью белого фона в 100 кд-ср/м<sup>2</sup> в течение 2 мин. Фотопические колбочковые ответные реакции регистрировали в серии из пяти белых вспышек с возрастающей интенсивностью (от 100 мкд-ср/м<sup>2</sup> до 12 кд-ср/м<sup>2</sup>). Было зарегистрировано 50 ответных реакций, которые усредняли для каждой интенсивности. Все стимулы производились на фоне в 100 кд-ср/м<sup>2</sup>. Амплитуды бета-волн определяли как разницу между минимумами альфа-волн и последующими положительными пиками каждого колебательного сигнала.

Максимальные амплитуды фотопических бета-волн (которые получены при 12 кд-ср/м<sup>2</sup>) всех обработанных smCBA-mGC1 (n=6) и обработанных hGRK1-mGC1 (n=8) мышей GC1KO (как обработанные, так и необработанные глаза) и изогенных контрольных мышей +/- усредняли и использовали для определения стандартных ошибок.

Такие расчеты проводили в каждой временной точке (от 4-недельного до 13-недельного срока после инъекции). Эти данные переносили в программу Sigma Plot для окончательного графического представления. Парный t-тест был использован для расчета значений P между обработанными и необработанными глазами внутри каждой группы промоторов (smCBA или hGRK1) и между каждой группой промоторов во времени (4-недельный срок после инъекции сравнивали с 3-месячным сроком после инъекции). Стандартный t-тест был использован для расчета значений P между глазами, обработанными smCBA-mGC1 и hGRK1-mGC1. Значимые различия были определены как значения P < 0,05. Поскольку некоторые из мышей из каждой обработанной группы были временно отстранены от зрительно-поведенческих исследований, общее число мышей, усредненное и представленное в каждой временной точке на фиг. 2A и 2B отличается. Три мыши из smCBA-mGC1-обработанной группы были отправлены на оптомоторное тестирование, оставшихся "n" из 3 мышей использовали для анализа ERG во время измерений в 8-, 10- и 12-недельные сроки (фиг. 2A). Две мыши из hGRK1-mGC1-обработанной группы были отправлены на оптомоторное тестирование, оставшихся "n" из 6 мышей использовали для анализа ERG во время измерений в 6-, 8-, 10- и 12-недельные сроки (фиг. 2B). Все мыши были отправлены на зрительно-поведенческий анализ, измеряемый на 13-недельном сроке после инъекции, с их возвратом в лаборатории авторов настоящего изобретения (smCBA-mGC1: n=3, hGRK1-mGC1: n=2) после завершения зрительно-поведенческих анализов.

#### Оптомоторное тестирование.

Фотопическую остроту зрения и контрастную чувствительность обработанных и необработанных глаз мышей GC1KO оценивали с помощью двух-альтернативной парадигмы вынужденного выбора, как было описано ранее (см., например, Umino et al., 2008; Alexander et al., 2007). Для тестирования чувствительности индивидуальных глаз одного и того же животного авторы настоящего изобретения воспользовались тем фактом, что зрение мышей имеет минимальное бинокулярное перекрывание, и что левый глаз является более чувствительным к вращению по часовой стрелке, а правый - к вращению против часовой стрелки (Douglas et al., 2005). Таким образом, в оптомоторном протоколе авторов настоящего изобретения "с разделением в случайном порядке" острота и порог контрастной чувствительности каждого глаза определялись отдельно и одновременно через ступенчатые функции для получения корректных реакций в обоих направлениях, по часовой стрелке и против часовой стрелки. Корректное определение картин вращения в направлении по часовой стрелке проводилось прежде всего посредством зрительных сигналов, поступающих из левого глаза, а корректные реакции в направлении против часовой стрелки были получены из зрительных сигналов, поступающих из правого глаза. Остроту определяли как самый высокий выход пороговой реакции пространственной частоты (100% контрастность), а контрастную чувствительность определяли как 100, деленное на самый низкий процентный выход пороговой реакции контрастной чувствительности. В случае фотопической остроты начальный стимул составлял 0,200 синусои-

дальных циклов/градус с фиксированной 100% контрастностью. Для измерения фотопической контрастной чувствительности начальная картина была представлена в виде 100% контрастности, с фиксированной пространственной частотой в 0,128 циклов/градус. Фотопическое зрение измеряли при средней освещенности в 70 кд/м<sup>2</sup>. Остроту зрения и контрастную чувствительность измеряли для обоих глаз каждой мыши от четырех до шести раз в течение периода в 1 неделю. Соответствующие по возрасту изогенные контрольные животные +/- (M1, M2) и интактные мыши GC1KO (M3, M4), наряду с smCBA-mGC1-обработанными (M5, M6, M7) и hGRK1-mGC1-обработанными мышами (M8, M9), представлены на фиг. 3. Опосредованные колбочками амплитуды ERG, вырабатываемые в ответ на стимул в 12 кд-ср/м<sup>2</sup> у всех мышей (M1-M9), представлены в дополнение к зрительно-поведенческим результатам. Непарные t-тесты были выполнены в отношении остроты и процентных показателей контрастной чувствительности для определения значимости полученных результатов. Обработка тканей:

Через три месяца после инъекции P14-обработанных мышей GC1KO и изогенных контрольных мышей +/- адаптировали к темноте в течение 2 ч. Непосредственно после темновой адаптации мышей забивали под тусклым красным светом (>650 нм). Каемки инъекцированных и неинъекцированных глаз маркировали горячей иглой в положении 12:00 ч, чтобы облегчить ориентацию. Энуклеацию осуществляли под тусклым красным светом и глаза немедленно помещали в 4% параформальдегид. Глаза, которые должны были быть использованы для изготовления срезов из замороженной ткани, обрабатывали в соответствии с ранее описанными методами (Hairet et al., 2006). Вкратце, из каждого глаза извлекали роговицу, оставляя хрусталик внутри остальной глазной чаши. Маленький "V"-образный надрез делали в склере рядом с ожогом в кайме для облегчения ориентации. После фиксации в течение ночи извлекали хрусталики и стекловидные тела. Глазную чашу, содержащую оставшуюся сетчатку/RPE (вращающийся платиновый электрод), помещали в раствор 30% сахарозы в PBS по меньшей мере на 1 ч при 4°C. Затем глазные чаши помещали в композицию в криостате (Tissue Tek OCT 4583; Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA) и быстро замораживали в бане из сухого льда/этанола. Криостатом делали серийные срезы глаз толщиной 10 мкм (Microtome HM550; Walldorf, Germany). Глаза, которые должны были быть использованы для анализа тотального препарата, обрабатывали в соответствии с ранее описанными методами (Pang et al., 2010). Ориентацию устанавливали так, как было описано выше. После фиксации в течение ночи роговицу, хрусталики, стекловидное тело и пигментный эпителий сетчатки извлекали из каждого глаза, не повреждая сетчатку. Срез делали в самой верхней (дорсальной) части сетчатки, примыкающей к исходному месту ожога в кайме для поддержания ориентации.

Иммунохимия и микроскопия.

Срезы замороженной ткани сетчатки и тотальных препаратов промывали 3× в 1X PBS. После указанных промываний образцы инкубировали в 0,5% Triton X-100(R) в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Затем образцы блокировали в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина (BCA) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы сетчатки инкубировали в течение ночи при 37°C с кроличьим поликлональным антителом против GC1 (1:200, sc-50512, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) или с кроличьим поликлональным антителом против аррестина колбочек ("Lumij" 1:1000; предоставлено Dr. Cheryl Craft, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA), разведенного в 0,3% Triton X-100(R)/1% BCA. Тотальные препараты сетчатки инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с тем же самым антителом против аррестина колбочек, разведенным 1:1000 в 0,3% Triton X-100(R)/1% BCA. После первичной инкубации срезы сетчатки и тотальные препараты промывали 3× в 1X PBS.

Срезы сетчатки инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами IgG, меченными либо флуорофором Alexa-594, либо флуорофором Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) и разведенными 1:500 в 1X PBS. После инкубации с вторичными антителами срезы и тотальные препараты промывали в 1X PBS. Осуществляли контрастное окрашивание срезов сетчатки, используя для этого 4',6'-диамино-2-фенилиндола (DAPI), в течение 5 мин при комнатной температуре. После последнего промывания в 1X PBS и промывания водой срезы обрабатывали средой на водной основе (DAKO) и помещали под покровное стекло. Тотальные препараты сетчатки ориентировали на предметном стекле микроскопа таким образом, чтобы самая верхняя (дорсальная) часть сетчатки была установлена в положение, соответствующее 12:00 ч. Образцы обрабатывали в среде DAKO и помещали под покровное стекло.

Срезы сетчатки изучали методом конфокальной микроскопии (спектральный конфокальный микроскоп Leica TCS SP2 AOBs, снабженный программным обеспечением LCS Version 2.61, Build 1537 (Banockburn, IL, USA)). Все изображения были сделаны при установке одинаковой экспозиции и при увеличении либо в 20×, либо в 63×. Длины волн возбуждения, используемые для DAPI, GC1 пятен аррестина колбочек, составляли, соответственно 405, 488 и 594 нм. Спектры испускания составляли соответственно 440-470, 500-535 и 605-660 нм. Тотальные препараты сетчатки изучали, используя флуоресцентный микроскоп с окуляром широкого поля обзора (AxioPlan 2) (Zeiss, Thornwood, NY, USA), оборудованный камерой QImaging Retiga 4000R и программным обеспечением QImaging QCapture Pro software (QImaging, Inc., Surrey, BC, Canada). Квадранты каждого тотального препарата были визуализированы при 5× при

установке одинаковой экспозиции, после чего их вместе обрабатывали в программе Photoshop® (Version 7.0) (Adobe, San Jose, CA, USA).

Анализ изображений.

Плотность фоторецепторов колбочек изучали в тотальных препаратах сетчатки путем подсчета клеток, меченных вторичным флюорофором, направленным на антитело против аррестина колбочек в центральной и нижерасположенной сетчатке, с помощью программного обеспечения ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Указанные показатели были получены при увеличении на файлах 5× TIFF, приведенных на фиг. 6. Пять квадратов (500 мкм<sup>2</sup>) помещали поверх идентичных областей в центральной и нижерасположенной сетчатке обработанных и необработанных глаз GC1KO. Для центральной сетчатки квадраты были расположены с равным эксцентриситетом вокруг головки глазного нерва во всех глазах (125 мкм). Фоторецепторы колбочек подсчитывали в каждой подходящей области сетчатки, значения усредняли, и определяли величины стандартных отклонений. Стандартный t-тест использовали для расчета значений P между заданными образцами. Значимость различий определяли как значение P<0,05.

Результаты.

Функция фоторецепторов (ERG) была восстановлена у AAV-обработанных мышей GC1KO.

Ранее сообщалось, что реакции колбочек у мышей GC1KO в 1-месячном возрасте слабо выражены. Здесь авторы настоящего изобретения показали, что P14-обработка (т.е. в постнатальный день 14) указанных мышей вектором AAV, несущим мышиный ген GC1 под контролем либо фоторецептор-специфического (hGRK1), либо убиквитарного (smCBA) промотора, приводит к существенному восстановлению фоторецепторной функции колбочек, что показано посредством ERG. Репрезентативные картины электроретинограмм колбочек (фиг. 1) (а также средние амплитуды фотопических бета-волн (фиг. 2A и 2B), полученные у hGRK1-mGC1-обработанных, smCBA-mGC1-обработанных мышей, мышей GC1KO и изогенных контролей +/-) показали, что функция колбочек в обработанных глазах восстанавливалась приблизительно до 45% от нормы к четвертой неделе после инъекции. Подобно более ранним сообщениям, реакции колбочек в контралатеральных необработанных глазах были к этому времени нарушены. К 4-недельному сроку после инъекции средние значения амплитуд опосредованных колбочками бета-волн в smCBA-mGC1-обработанных глазах (65,1 мкВ) были значительно выше (P=0,006) таковых в необработанных глазах (3,9 мкВ). Среднее значение амплитуды опосредованных колбочками бета-волн в hGRK1-mGC1-обработанных глазах (59,1 мкВ) было значительно выше (P<0,001), чем таковые в необработанных глазах (3,2 мкВ). Уровень восстановления, достигаемый через 4 месяца после доставки фоторецептор-специфического вектора hGRK1-mGC1, незначительно отличался от такового, который достигался под действием убиквитарного промотор-содержащего вектора smCBA-mGC1 (P=0,604). Через 3 месяца после инъекции среднее значение амплитуды опосредованных колбочками бета-волн в smCBA-mGC1-обработанных глазах (53,3 мкВ) было значительно выше (P<0,001), чем в необработанных глазах (2,8 мкВ). Среднее значение амплитуды опосредованных колбочками бета-волн в hGRK1-mGC1-обработанных глазах (45,3 мкВ) было значительно выше (P<0,001), чем в необработанных глазах (3,4 мкВ). Уровень восстановления, достигаемый через 3 месяца после доставки фоторецептор-специфического вектора GRK1-mGC1, незначительно отличался от такового, который достигался под действием убиквитарного промотор-содержащего вектора smCBA-mGC1 (P=0,331). Оба промотора за короткое время обеспечивали сходные уровни функционального восстановления колбочек в обработанных глазах мышей GC1KO. Важно то, что восстановление функции фоторецепторов колбочек оставалось стабильным в течение 3 месяцев (последняя временная точка, в которой проводилась оценка в настоящем исследовании (см. фиг. 1, 2A и 2B)). Не было обнаружено значимых различий в фотопических амплитудах бета-волн smCBA-mGC1-обработанных или hGRK1-mGC1-обработанных глазах между 4-недельным и 3-месячным сроками после обработки (P=0,174 и 0,125 соответственно).

Латентность, или время до пика в ERG, которая является важным признаком в диагностике различных признаков расстройств сетчатки, включая другие формы LCA (Sun et al., 2010), была также определена. В то время как такой показатель нельзя получить на глазу GC1KO (в таких глазах отсутствуют реакции ERG), тем не менее можно сравнить времена до пика колбочковых бета-волн у AAV-mGC1-обработанных и изогенных контрольных мышей +/- . Через 4 недели после инъекции, никаких значимых различий между временами до пика колбочковых бета-волн в обработанных и контрольных глазах мышей +/- обнаружено не было (P=0,884); средние значения у AAV-mGC1-обработанных и контрольных глаз +/- в этой временной точке составляли, соответственно, 50,8 и 50,4 мс. Через 3 месяца после инъекции также никаких значимых различий между указанными двумя группами не наблюдалось (P=0,697); средние значения по всем временам до пика колбочковых бета-волн в обработанных и контрольных глазах +/- составляли, соответственно, 59,7 и 58,3 мс. Кинетика реакции колбочек в сетчатке у обработанных GC1KO (определяемая посредством измерений времени до пика) в указанные короткие сроки выглядела нормально.

Ранее сообщалось, что опосредованные палочками картины электроретинограмм у мышей GC1KO отличаются изменениями к 1-месячному сроку жизни со значительным ослаблением палочковых альфа-

волн и бета-волн (Yang et al., 1999). Указанное ослабление выходит на плато к 5-месячному возрасту с ответами, приблизительно составляющими 50-70% от таковых у мышей дикого типа (WT). Хотя в некоторых случаях и наблюдалось AAV-mGC1-опосредованное улучшение в обработанных глазах мышей GC1KO по сравнению с необработанными контролями (пример см. на фиг. 1), этот результат не сопоставим с результатом, наблюдаемым на уровне опосредованных колбочками реакций.

У AAV-обработанных мышей восстанавливалось зрительно-реактивное поведение.

Оптомоторный анализ позволил выявить, что глаза мышей GC1KO, обработанных либо smCBA-mGC1 (M5, M6, M7), либо hGRK1-mGC1 (M8, M9), реагировали значительно лучше, чем необработанные глаза, при всех фотопических, опосредованных колбочками, условиях. Необработанные глаза GC1KO реагировали слабо, с остротой зрения  $0,163 \pm 0,040$  циклов/градус (фиг. 3B и 3C, масштабная линейка, среднее  $\pm$  s.d., n=9 глазам). Изогенные контрольные глаза GC1<sup>+/+</sup> (M1, M2) реагируют значительно лучше со средней остротой зрения  $0,418 \pm 0,046$  циклов/градус (n=4 глазам). AAV-mGC1-обработанные глаза (M5-M9) имеют среднюю остроту зрения  $0,392 \pm 0,077$  циклов/градус (n=5 глазам), уровень, по существу идентичный таковому контрольных глаз +/+, и значительно лучший, чем в случае необработанных глаз GC1KO (P<0,0001). Фотопическую контрастную чувствительность (фиг. 3B и 3C) сравнивали с результатами фотопической остроты зрения, при этом в AAV-mGC1-обработанных глазах (контрастная чувствительность  $11,9 \pm 7,37$ , n=5 глазам) контрастная чувствительность оказалась почти идентичной таковой у мышей +/+ ( $11,94 \pm 3,03$ , n=4 глазам). Здесь тоже глаза GC1KO, обработанные AAV-mGC1 в постнатальный день 14 (P14), реагировали значительно лучше, чем необработанные глаза, контрастная чувствительность которых составляла  $1,27 \pm 0,31$  (n=9, P<0,0001). Во всех фотопических тестах необработанные глаза GC1KO имели очень слабые показатели, по существу эквивалентные отсутствию опосредованной колбочками функции. Статистические сравнения указанных измерений представлены в таблице 1. Опосредованные колбочками картины ERG всех GC1<sup>+/+</sup> (M1, M2), GC1KO (M3, M4), smCBA-mGC1-обработанных (M5, M5, M7) и hGRK1-mGC1-обработанных (M8, M9) мышей, использованных в анализах на зрительно-реактивное поведение, представлены на фиг. 3A для сравнения зрительной функции (оптомоторное поведение) с функцией сетчатки (электрофизиология).

Функция палочек сетчатки (ERG) частично сохранена у мыши GC1KO. Исследования показали, что даже очень малые амплитуды ERG преводятся в стойкое зрительно-реактивное поведение (Williams et al., 2006). Фактически пациенты с LCA2, которые получали AAV-RPE65-терапию, обнаруживали восстановление зрительно-реактивного поведения, несмотря на полное отсутствие реакции ERG (Maguire et al., 2008). Оптомоторное тестирование выявило, что скотопические, т.е. опосредованные палочками, острота зрения и контрастная чувствительность глаз GC1KO очень сходны с контрольными +/+. По этой причине невозможно было на поведенческом уровне сравнить восстановление зрения в обработанных и необработанных глазах. Статистические сравнения указанных измерений представлены в таблице.

Статистические сравнение фотопических зрительных функций глаз у мышей WT, AAV-MGC1-обработанных и необработанных глаз, измеряемых на уровне оптомоторного поведения

Фотопическая острота зрения	Мыши дикого типа (WT)	Обработанные	Необработанные
Количество оценок	4	5	9
Среднее	0,4183	0,3919	0,163
Стандартное отклонение	0,0456	0,07731	0,03954
		<b>Значение P</b>	
	WT по сравнению с обработанными	0,5671	Не значимо
	WT по сравнению с необработанными	<0,0001	*
	Обработанные по сравнению с необработанными	<0,0001	*
Фотопическая контрастная чувствительность	Мыши дикого типа (WT)	Обработанные	Необработанные
Количество оценок	4	5	9
Среднее	11,94	11,16	1,27
Стандартное отклонение	3,03	7,37	0,31
		<b>Значение P</b>	
	WT по сравнению с обработанными	0,4186	Не значимо
	WT по сравнению с необработанными	<0,0001	*
	Обработанные по сравнению с необработанными	<0,0001	*
		*=P<0,0001	

Оба промотора, фоторецептор-специфический и убиквитарный, направляют экспрессию mGC1-трангена в палочках и колбочках мышей GC1KO:

Дефицит GC1 действует как на палочковидные, так и на колбочковидные фоторецепторы у пациентов с LCA1. Человеческий фоторецептор-специфический промотор RK, убиквитарный промотор smCBA были, следовательно, выбраны для данного исследования в качестве средства для нацеливания на оба

этих типа клеток. Человеческий промотор RK был выбран в силу его малого размера и способности эффективно направлять трансгенную экспрессию в фоторецепторных клетках. Иммуноокрашивание сетчаток GC1KO через 3 месяца после AAV-hGRK1-mGC1-обработки позволило выявить, что указанный промотор устойчиво направлял экспрессию GC1 в наружных сегментах фоторецепторов. На репрезентативном изображении поперечного сечения сетчатки глаза, в который инъецировали указанный терапевтический вектор (фиг. 4A), показано интенсивное окрашивание GC1 в слое OS, тогда как в контралатеральном необработанном глазу из той же самой мыши, отсутствует какая бы то ни была экспрессия GC1 (фиг. 4B). Промотор smCBA также эффективно направляет экспрессию GC1 в фоторецепторных клетках. Фоторецепторы OS обнаружили устойчивую smCBA-опосредованную экспрессию GC1 в обработанных глазах (фиг. 4C) по сравнению с контралатеральным необработанным глазом (фиг. 4D). Уровни hGRK1- и smCBA-опосредованной экспрессии GC1 близки к таковым, наблюдаемым в изогенных, контрольных +/- глазах (фиг. 4E). Экспрессия GC1 в hGRK1-mGC1-обработанных глазах была ограничена слоем OS. В smCBA-mGC1-обработанных глазах экспрессия GC1 была случайно обнаружена в тельцах наружного ядерного слоя фоторецепторных клеток (см., например, стрелки на фиг. 4F). Следует, однако, отметить, что ни одна промоторная конструкция не направляла экспрессию терапевтической GC1 за пределами фоторецепторных клеток. Такое отсутствие экспрессии вне мишени способствует развитию будущих клинических применений.

У AAV-mGC1-обработанных мышей GC1KO была восстановлена транслокация аррестина колбочек.

Обработка AAV-mGC1 восстанавливала индуцируемую светом транслокацию аррестина в колбочковидные фоторецепторы в обработанной сетчатке мышей GC1KO. Репрезентативное иммуноокрашивание поперечных срезов обработанных, необработанных и +/- сетчаток антителом, полученным против аррестина колбочек, показало, что аррестин колбочек локализован в наружных сегментах, внутренних сегментах, аксонах и синаптических окончаниях +/-, smCBA-mGC1-обработанных и hGRK1-mGC1-обработанных колбочковидных фоторецепторов (фиг. 5A, 5C и 5D соответственно). И наоборот, в сетчатке необработанных мышей GC1KO аррестин колбочек оставался локализованным в основном в наружных сегментах колбочек (фиг. 5B). Этот результат согласуется с представлением, что колбочки в сетчатке мышей GC1KO являются хронически гиперполяризованными. В обработанных, адаптированных к темноте сетчатках было выявлено не только восстановление локализации аррестина колбочек, но также и заметная положительная регуляция белка по сравнению с необработанными контролями. Что важно, плотность колбочковидных клеток тоже заметно повышалась в обработанных глазах по сравнению с необработанными контролями (см., например, фиг. 5A-5C).

У AAV-mGC1-обработанных мышей GC1KO были сохранены фоторецепторы колбочек.

Анализ smCBA-mGC1- и hGRK-mGC1-обработанных и неинъецированных контралатеральных тотальных препаратов сетчатки через 3 месяца после инъекции терапевтического вектора, которые были окрашены антителом против аррестина колбочек, показал, что в результате обработки указанным терапевтическим вектором колбочковидные фоторецепторы сохранялись (фиг. 6). Подсчет колбочковидных фоторецепторов в низлежащих и центральных областях сетчатки в обработанных и необработанных тотальных препаратах сетчатки показал, что между ними имеется статистически значимое различие в плотности колбочковидных клеток в обработанных и необработанных глазах. Такой результат сопоставим с наблюдением, что прочное электрофизиологическое и зрительно-поведенческое восстановление является совершенно очевидным. P14-обработка мышей GC1KO одной из терапевтических конструкций способствовала сохранению структуры колбочковидных фоторецепторов по меньшей мере в течение трех месяцев.

Пример 2. Животные модели с двойным нокаутом GC1/GC2.

Важно отметить, что, хотя у мышей GC1KO задеты только колбочковидные фоторецепторы (палочки только частично теряют функцию и не подвергаются дегенерации), у пациентов с LCA1 наблюдается потеря функции палочек и их дегенерация. Предполагается, что причиной указанных различий может быть видоспецифическая разница в зависимости [системы] от GC2, близкородственной гуанилатциклазе 1 (GC1), которая экспрессирована в колбочковидных фоторецепторах. Мышинные палочки способны функционировать в отсутствие GC1 в основном за счет того, что GC2 способна восстанавливать активность; однако у человека это не так. GC1 необходима для функционирования палочек, поэтому происходит дегенерация палочек. Была создана мышьяная модель с двойным нокаутом GC1/GC2, и на ней была показана потеря функции палочек (вдобавок к потере функции колбочек, как видно у GC1 K/O) (Baehr et al., 2007). Биохимическими исследованиями на этой модели было доказано, что GC2 является ферментом, обеспечивающим функцию палочек в отсутствие GC1. С другой стороны, именно мыши с двойным нокаутом GC1/GC2 более адекватно имитируют данное патологическое состояние у человека (поражаются и колбочки, и палочки) (Kagan et al., 2010). Для проверки обоих векторов, gAAV-smCBA-mGC1 и gAAV-hGRK1-mGC1, на мышях с двойным нокаутом GC1/GC2 векторы gAAV доставляли в точности таким же образом и точно в такое же время (постнатально на 14-й день), что и в описанном выше исследовании мышей с нокаутом GC1. Анализ восстановления зрения как на физиологическом, так и на зрительно-поведенческом уровнях тоже предпринимали в точности таким же образом, как описано выше при исследовании мышей с нокаутом GC1. Особое внимание следует обратить на скотопические реакции

(т.е. ответ палочек), поскольку у мышей с двойным нокаутом GC1/GC2, обработанных векторной конструкцией GC1, предполагается достичь измеряемого уровня восстановления функции палочек.

Пример 3. Гуманизированная мышьяная животная модель LCA1.

В данном примере описано создание "гуманизированной" мышьяной животной модели LCA1. В одном из воплощений указанная мышьяная модель содержит нокаут GC1/GC2/GCAP1. GCAP1 является белком, который активирует GC1. Для создания системы *in vivo*, в которой может быть оценена функция человеческой GC1, экспрессируемой с вектора gAAV клинической категории, сконструированного для применения на человеке, использовали трансгенную мышшь hGCAP1 с тройным нокаутом GC1/GC2/GCAP1. У указанной мыши зрительная функция осуществлялась только путем gAAV-опосредованного взаимодействия hGC1 с hGCAP1 (т.е. эндогенная мышьяная GCAP1 у нее отсутствует). Из такого исследования можно определить, необходим ли человеческий белок GCAP1 для стимуляции активности GC1 в модельной мышши, а также, может ли быть восстановлена функция колбочек и палочек, когда два этих человеческих полипептида восстановлены и экспрессированы у нечеловеческой (т.е. мышьяной) модели данного заболевания. Для создания трансгенной мышши hGCAP1 с тройным нокаутом GC1/GC2/GCAP1 мышшь с двойным нокаутом GC1/GC2 (Baehr et al., 2007) скрещивали с мышью с нокаутом GCAP1 (Mendez et al., 2001). Затем человеческий GCAP1 трансгенно экспрессировали у животной модели для получения трансгенной мышши hGCAP1 с тройным нокаутом GC1/GC2/GCAP1. Исследования, в которых указанным животным обеспечивали gAAV-направленную hGC1, проводили способом, по существу идентичным способам, использованным в случае изучения мышшей с нокаутом GC1. Затем предпринимали анализ восстановления зрения как на физиологическом, так и на зрительно-поведенческом уровнях и в точности таким же образом, как в случае исследования мышшей с нокаутом GC1.

Пример 4. Иллюстративные векторные конструкции, применимые при осуществлении настоящего изобретения.

Карты указанных двух иллюстративных векторов представлены на фиг. 11. Один из них содержит неспецифический промотор smCBA, а другой содержит промотор GRK1, ограниченный палочками/колбочками. Оба они упакованы в AAV серотипа 5. Все дозы векторов, тестируемые на настоящий момент, сохраняются в сетчатке мышши. Затем когорты мышшей GC1<sup>-/-</sup> подвергали субретинальному инъекционному в постнатальный день 14 (P14), а затем периодически анализировали методами ERG и фотопической оптокинетики на предмет зрительно-реактивного поведения (опосредованного колбочками). Поскольку у мышшей GC1<sup>-/-</sup> сохранялась опосредованная палочками картина ERG, мониторинг сохранения функции был сфокусирован прежде всего на восстановлении функции колбочек. В связи с вектором smCBA картины электроретинограмм ERG оценивали через 4 недели после обработки и после этого каждые 2 недели вплоть до 12-13-недельного срока после обработки. Все 9 глаз обрабатывали у 9 мышшей, реагировавших на лечение. Приведенные ниже результаты свидетельствуют о значительном восстановлении фотопических амплитуд ERG в глазах животных, у которых в необработанном контроле электроретинограмма по существу не регистрировалась, приблизительно до 50% от нормы в контралатеральных глазах, обработанных вектором.

Затем анализировали четырех мышшей GC1<sup>-/-</sup> методом скотопической оптокинетики на предмет зрительно-реактивного поведения с целью определения различий между обработанными и необработанными контралатеральными глазами (показано ниже). Во всех четырех обработанных глазах (289, 290, 294, 295) наблюдалось значительное улучшение остроты зрения по сравнению с их парными контрольными глазами, и у трех из четырех животных значительно улучшилась контрастная чувствительность. Мыши 297 и 298 были контрольными мышшами дикого типа, а мышшь 299 была необработанной мышью GC1<sup>-/-</sup>. Полученные результаты показывают, что с помощью вектора достигается функциональное восстановление и восстановление поведения, опосредованного зрительной реактивностью колбочек, у животной модели LCA1.

В связи с вектором GRK1, экспрессия которого ограничена палочками и колбочками, картины ERG оценивали у 14 мышшей GC1<sup>-/-</sup>, обработанных на один глаз, через 4 недели после обработки, а дальше через каждые 2 недели вплоть до 12-13-недельного срока после обработки. 12 из 14 обработанных глаз у 12 животных реагировали на лечение. Приведенные результаты (показаны ниже) свидетельствуют о значительном восстановлении фотопических амплитуд ERG в глазах животных, у которых в необработанном контроле электроретинограмма по существу не регистрировалась, приблизительно до 40% от нормы в контралатеральных глазах, обработанных вектором.

Затем одну мышшь GC1<sup>-/-</sup> (293) анализировали методом скотопической оптокинетики на предмет зрительно-реактивного поведения с целью определения различий между обработанными и необработанными контралатеральными глазами (показано ниже). У этой мышши наблюдалось значительное улучшение как остроты зрения, так и контрастной чувствительности в правом глазу, обработанном указанным вектором, по сравнению с их контрольным левым глазом. Реакции были почти эквивалентны таковым контрольных мышшей дикого типа (297 и 298) и были значительно улучшены по сравнению с необработанной мышью GC1<sup>-/-</sup> (299). Было, следовательно, сделано заключение, что вектор GRK1 также вызывал функциональное восстановление и восстановление поведения, опосредованного зрительной реактивно-

стью колбочек, у данной модели LCA1.

Пример 5. Специфическое нацеливание WTGC1 на колбочки улучшает восстановление.

Представленные выше данные определенно свидетельствуют, что функция колбочек и опосредованное колбочками зрительно-реактивное поведение может быть восстановлено промотором GRK1, ограниченным палочками/колбочками. Поскольку у человека при LCA1 обнаруживается как дефицит палочек, так и дефицит колбочек (в отличие от мышей GC1<sup>-/-</sup>, у которых прежде всего имеет место дефицит колбочек), необязательно в дальнейшем ограничивать экспрессию только специфичностью в отношении колбочек. Однако на мышиной модели существует один конечный колбочковый фенотип, который важен для изучения: в условиях адаптации к темноте не происходит нормальное перемещение аррестина колбочек из наружных сегментов колбочек во внутренние сегменты, аксоны и синаптические окончания, как это происходит в сетчатке мышей дикого типа. Поэтому были предприняты исследования с целью установления того, возможна ли также и коррекция биологического фенотипа таких клеток при обработке вектором глаз мышей GC1<sup>-/-</sup>. В приведенных результатах один глаз у мышей GC1<sup>-/-</sup> обрабатывали вектором GRK1, затем к 7-недельному сроку после инъекции мышью адаптировали к темноте. Затем обработанные (нижняя панель) и контрольные (верхняя панель) сетчатки изучали иммуногистохимически на предмет локализации аррестина в колбочках. В необработанной сетчатке GC1<sup>-/-</sup> (верхняя панель) аррестин колбочек в основном оставался в наружных сегментах (OS) колбочек и в синаптическом слое (SL). В отличие от этого, в контралатеральной обработанной сетчатке (нижняя панель) существенная фракция аррестина (~50%) была транслоцирована во внутренние сегменты и синаптические окончания. Следовательно, было сделано заключение, что обработка вектором восстанавливала также и корректную транслокацию аррестина колбочек.

Пример 6. Долгосрочная терапия LCA1 под действием гAAV-направленных генетических конструкций.

Приведенные выше примеры показали, что субретинальная инъекция векторов гAAV, содержащих кДНК мышиной GC1 (направляемую либо промотором фоторецептор-специфической человеческой родопсинкиназы [hGRK1], либо убиквитарным промотором [smCBA]), способна восстановить опосредованную колбочками функцию и зрительно-реактивное поведение, а также защищать фоторецепторы колбочек у мышей GC1KO по меньшей мере в течение трех месяцев.

В данном примере авторы настоящего изобретения оценивали возможность достижения длительной терапии на модели заболевания LCA1, воспроизведенного у грызунов. Кроме того, авторы настоящего изобретения изучали вопрос о том, возможно ли, чтобы доставка GC1 к фоторецепторам мышей (GCdko) с двойным нокаутом GC1/GC2, - модели, в которой происходит утрата структуры и функции палочек и колбочек и которая фенотипически похожа на человеческий LCA1, - осуществляла терапию указанных клеток.

Способы.

Субретинальные инъекции AAV5-hGRK1-mGC1, AAV5-smCBA-mGC1 или высокоэффективного капсульного мутанта по тирозину AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 были введены в один глаз мышей GC1KO или GCdko в период между постнатальным днем 14 (P14) и P25. Функцию фоторецепторов палочек и колбочек изучали электроретинографически. Локализацию терапевтической экспрессии GC1 и степень восстановления фоторецепторов колбочек изучали иммуногистохимически. Исследования по биораспределению были предприняты с целью оценки наличия векторных геномов в зрительных нервах и мозгу обработанных животных.

Результаты.

Функция фоторецепторов колбочек восстанавливалась у мышей GC1KO, обработанных всеми векторами, при этом наиболее эффективным оказался вектор AAV8(733). Реакции оставались стабильными по меньшей мере в течение 10 месяцев после обработки. Терапевтическая GC1 была обнаружена в фоторецепторных наружных сегментах. Через 10 месяцев после инъекции геномы векторов AAV5 и AAV8(733) обнаруживались только в оптических нервах обработанных глаз мышей GC1KO. AAV8(733)-направленная mGC1 сохраняла функцию и палочек, и колбочек у обработанных мышей GCdko.

Заключение.

Длительной терапии достигали у мышей GC1KO, модели дефицита GC1 у млекопитающих, с помощью описанных здесь гAAV-векторных конструкций. Важно то, что терапевтический эффект достигался также и у мышей GCdko, у которых имитирован LCA1-фенотип палочек/колбочек. Полученные результаты служат надежной основой для генной терапии на основе гAAV-векторов с целью лечения дистрофий сетчатки, и в частности лечения LCA1.

Пример 7. Длительная защита колбочковидных фоторецепторов и восстановление функции колбочек под действием генной терапии у мышей GC1KO.

В предыдущих примерах было показано, что субретинально вводимые векторы AAV5, содержащие кДНК мышиной GC1, направляемую либо фоторецептор-специфическим промотором (hGRK1), либо убиквитарным промотором (smCBA), способны восстанавливать опосредованную колбочками функцию и зрительно-реактивное поведение, а также предохранять колбочковидные фоторецепторы у мышей GC1KO в течение трех месяцев. В данном примере, используя ту же самую мышиную модель, оценивали

возможность длительной терапии. AAV5-hGRK1-mGC1, AAV5-smCBA-mGC1 или вектор высокоэффективного капсидного мутанта по тирозину, AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, вводили субретинально мышам GC1KO между постнатальным днем 14 (P14) и постнатальным днем 25 (P25). Функцию сетчатки изучали посредством электроретинограмм (ERG). Локализацию AAV-опосредованной экспрессии GC1 и выживаемость колбочек изучали иммуногистохимически и распределение векторных геномов за пределами сетчатки количественно оценивали посредством PCR зрительного нерва и ткани мозга. Функция колбочек восстанавливалась всеми протестированными векторами, при этом наиболее эффективным оказался вектор AAV8(Y733F). AAV-опосредованную экспрессию GC1 обнаруживали исключительно в фоторецепторах. Через 10 месяцев после инъекции геномы векторов AAV обнаруживались только в зрительном нерве обработанных глаз мышей. Эти результаты впервые продемонстрировали возможность достижения длительной терапии дефицита GC1 на животной модели млекопитающих.

Гуанилатциклаза-1 (GC1) сетчатки, кодируемая GUCY2D, выполняет ключевую функцию по фототрансдукции у позвоночных (Pugh et al., 1997). В результате светового стимула вторичный мессенджер цГМФ (цГМФ) подвергается быстрому гидролизу под действием фосфодиэстераз (PDE6) внутри фоторецепторных клеток, что приводит к закрытию цГМФ-воротных катионных каналов и гиперполяризации клетки. Когда цитоплазматический уровень  $[Ca^{2+}]$  падает ниже 50 нМ, GC1 активируется под действием малых  $Ca^{2+}$ -связывающих белков, GCAP (белки, активирующие гуанилатциклазу). GC1 синтезирует цГМФ, который связывает и повторно открывает цГМФ-воротные каналы, возвращая фоторецептор в "темновое", деполяризованное состояние (Pugh et al., 1997; Polans et al., 1996; Wensel, 2008; Lamb and Pugh, 2006; Arshavsky et al., 2002). Таким образом, GC1 играет жизненно важную роль в циклах свет/темнота и циклах восстановления, твердо закрепляя, посредством цГМФ, петлю обратной связи между уровнями внутриклеточного кальция и поляризационным состоянием фоторецепторов.

GC1 экспрессируется в наружных сегментах палочковидных и колбочковидных фоторецепторов сетчатки человека, обезьяны и мышей (Dizhoor et al., 1994; Liu et al., 1994; Haire et al., 2006). Подобно другим мембранным гуанилатциклазам, она содержит N'-концевую сигнальную последовательность, внеклеточный домен (ECD), единственный трансмембранный домен, киназоподобный гомологичный домен (KHD), димеризационный домен (DD) и C'-концевой каталитический домен (CCD) и, вероятно всего, присутствует в виде гомомерных димеров (Yang and Garbers, 1997). Мутации в GUCY2D ассоциированы с рецессивным врожденным амаврозом Лебера типа 1 (LCA1), а также с доминантными и рецессивными формами палочко-колбочковой дистрофии, CORD6 и CORD соответственно (Perrault et al., 1996; Perrault et al., 2000; Kelsell et al., 1998; Perrault et al., 1998; Gregory-Evans et al., 2000; Weigell-Weber et al., 2000; Ugur et al., 2010). LCA1 представляет собой тяжелое, приводящее к слепоте, аутосомно-рецессивное расстройство с ранним началом, характеризующееся стертой электроретинограммой (ERG), которая предшествует дегенерации фоторецептора (Perrault et al., 1999; Chung and Traboulsi, 2009). CORD6 является доминантным расстройством, характеризующимся прогрессирующей дегенерацией фоторецепторов, начинающейся с колбочек, вызывающей раннюю потерю остроты зрения, с последующей дегенерацией палочек, приводящей к прогрессирующей куриной слепоте и потере периферического зрения (Kelsell et al., 1998; Perrault et al., 1998). CORD6-мутации ограничены димеризационным доменом (DD) и обычно вызывают повышение GCAP-опосредованной активации GC1 (Payne et al., 2001; Downes et al., 2001; Wilkie et al., 2000). Найденная в настоящее время рецессивная, вызывающая CORD мутация локализована в каталитическом домене (CD) гуанилатциклазы-1, и полагают, что она является причиной общего снижения функции этого фермента (Ugur et al., 2010). Вызывающие LCA1 мутации распределены по всей длине доменов ECD, KHD, DD и CCD гуанилатциклазы-1 (Karan et al., 2010). Такие мутации меняют структуру фермента и его стабильность, могут воздействовать на ретроградный транспорт других ассоциированных с мембраной белков и часто являются нулевыми.

Мыши GC1KO являются носителями нулевой мутации в Gucy2e, мышинном гомологе GUCY2D. Подобно LCA1 у пациентов, потеря функции колбочек у данной модели предшествует дегенерации колбочек (Timmers et al., 2001). Палочки на 30-50% сохраняют свою функцию и не подвергаются процессу дегенерации в силу присутствия GC2, другой функциональной гуанилатциклазы в мышинных фоторецепторах (Yang and Garbers, 1997; Jacobson et al., 2006; Timmers et al., 2001; Cideciyan et al., 2008; Song et al., 2002). В предыдущих примерах было показано, что субретинальная инъекция векторов аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 5, содержащих кДНК мышинной GC1, направляемую либо промотором фоторецептор-специфической человеческой родопсинкиназы (hGRK1), либо убиквитарным промотором (smCBA), способна восстанавливать опосредованную колбочками функцию и зрительно-реактивное поведение, а также в течение трех месяцев защищать колбочковидные фоторецепторы у мышей GC1KO. В данном исследовании оценивали возможности AAV-опосредованной заместительной генной терапии в отношении длительного лечебного эффекта у мышей GC1KO. AAV5-hGRK1-mGC1 и AAV5-smCBA-mGC1, а также вектор высокоэффективного капсидного мутанта по тирозину, AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, вводили субретинально мышам GC1KO между постнатальным днем 14 (P14) и постнатальным днем 25 (P25). Эти результаты впервые продемонстрировали возможность достижения длительной терапии дефицита GC1 на животной модели млекопитающих. Биораспределение векторного генома оценивали также и в случае векторов на основе AAV5 и AAV8(733). Эти результаты

обеспечивают прямой выход на развитие клинических испытаний в плане терапии LCA1 на основе вектора AAV (а возможно, и палочко-колбочковых дистрофий), а также помощь в создании стандартизованного вектора для широкого класса рецессивных дегенеративных процессов в сетчатке, опосредованных дефектами в фоторецептор-ассоциированных генах.

Материалы и методы.

Экспериментальные животные.

Мышей GC1KO и конгенных контрольных мышей +/+, полученных в результате гетерозиготных скрещиваний мышей GC1<sup>+/-</sup>, предоставленных компанией Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), выводили и поддерживали в институте, где работают авторы настоящего изобретения, в помещении для содержания животных, с 12-часовым циклом чередования света/темноты. Пищу и воду животным предоставляли в неограниченном количестве. Все исследования на животных проводились в соответствии с утвержденными правилами ARVO по использованию животных в офтальмологических испытаниях по изучению зрительной функции и в соответствии с правилами NIH.

Конструирование векторов AAV.

Векторные плазмиды аденоассоциированного вируса (AAV5) серотипа 5, содержащие либо убиквитарный промотор (smCBA), либо промотор фоторецептор-специфической человеческой родопсинкиназы (hGRK1), направляющий кДНК мышшиной GC1 (mGC1), были сконструированы в соответствии с описанными ранее способами (Boye et al., 2010). Сайт-направленный мутагенез экспонированных на поверхности тирозиновых остатков на капсиде AAV2 был описан ранее (Zhong et al., 2008). Сходные методы были использованы и для конструирования описанного здесь капсидного мутанта AAV8(Y733F). Все векторы были упакованы, очищены и оттитрованы в соответствии с ранее описанными методами (Zolotukhin et al., 2002; Jacobson et al., 2006). Полученные в результате титры AAV5-smCBA-mGC1, AAV5-hGRK1-mGC1 и AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 составляли  $4,69 \times 10^{12}$  векторных геномов на 1 мл (вг/мл),  $4,12 \times 10^{13}$  и  $1,08 \times 10^{13}$  вг/мл соответственно.

Субретинальные инъекции.

1 мкл AAV5-smCBA-mGC1 ( $4,69 \times 10^9$  векторных геномов), AAV5-hGRK1-mGC1 ( $4,12 \times 10^{10}$  векторных геномов) или AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 ( $1,08 \times 10^{10}$  векторных геномов) инъецировали субретинально в один глаз мыши GC1KO в период между постнатальным днем 14 (P14) и постнатальным днем 25 (P25). Контралатеральный глаз оставляли неинъецированным. Субретинальные инъекции производили так, как было описано ранее (Timmers et al., 2001). Дальнейшие анализы производили только у тех животных, которые получили сравнимые, успешные инъекции (>60% отслоения сетчатки с минимальными осложнениями). Приблизительно 75% всех когорт получили "успешные" инъекции. Твердо установлено, что область вирусной трансдукции по меньшей мере соответствует области отслоения сетчатки (Timmers et al., 2001; Cideciyan et al., 2008).

Электроретинографический анализ.

Электроретинограммы (ERG) обработанных GC1KO и подобранных по возрасту конгенных (+/+) контролей регистрировали, используя контроль на основе PC и регистрирующий элемент (Toennies Multiliner Vision; Jaeger/Toennies, Hochberg, Germany), согласно ранее описанным способам, с незначительными модификациями (Haire et al., 2006; Boye et al. 2010). Измерения у мышей GC1KO, обработанных AAV5-smCBA-mGC1 (n=10), мышей GC1KO, обработанных AAV5-hGRK1-mGC1 (n=6), мышей GC1KO, обработанных AAV8(Y733F) (n=6), и конгенных (+/+) контролей (n=8) начинали в разные дни, и, следовательно, длительность мониторинга каждой подгруппы мышей несколько отличалась. ERG обработанных мышей GC1KO проводили через 4 недели после инъекции, а затем каждый месяц, до 1 года после инъекции (AAV5-обработанные мыши) или до 9 месяцев после инъекции (AAV8[Y733F]-обработанные мыши). Подобранных по возрасту конгенных (+/+) контрольных мышей отслеживали в течение 8 месяцев. Мышей выводили из эксперимента на разных стадиях его проведения с целью осуществления различных посмертных исследований (изучение биораспределения, иммуногистохимический анализ сетчатки, RT-PCR ткани сетчатки в режиме реального времени) или же по причине неожиданной болезни/смерти. Данные ERG были представлены только для групп животных при n>3. Следовательно, в данном исследовании сравниваются результаты 9-месячных наблюдений после инъекции для группы мышей, обработанных AAV5, и результаты 6-месячных наблюдений после инъекции для группы мышей, обработанных AAV8(Y733F). Обработанные мыши продолжали проявлять ERG-реактивность и после указанного периода, однако число образцов было уже значительно уменьшено, и статистический анализ утрачивал всякий смысл. В качестве подтверждения этого утверждения представлены репрезентативные опосредованные колбочками картины электроретинограмм от индивидуальной мыши через 1 год после обработки вектором AAV5 и через 9 месяцев после обработки вектором AAV8(Y733F). Скотопические (опосредованные палочками) и фотопические (опосредованные колбочками) записи электроретинограмм были получены регистрацией параметров, описанных ранее (Boye et al., 2010). Амплитуды бета-волн определяли как разницу между минимумом альфа-волны и последующим положительным пиком каждого колебательного сигнала. Опосредованные палочками реакции ERG у необработанных мышей GC1KO варьируют от животного к животному (Yang et al., 1999), и, следовательно, большие стандартные откло-

нения наблюдались при усреднении амплитуд скотопических альфа- и бета-волн от разных животных. Данные ERG палочек представлены в виде отношения (среднее внутри-индивидуальных (т.е. парных глаз одного и того же животного) амплитуд альфа- и бета-волн палочек обработанного и необработанного глаза). Как таковые, любые значения выше 1 указывают на то, что обработка AAV-mGC1 улучшила реакцию палочек. Отношения вычисляли, используя амплитуды, вырабатываемые в ответ на стимул в 1 кд-ср/м<sup>2</sup>. Фотопические, опосредованные колбочками максимальные амплитуды бета-волн в инъекцированных и неинъекцированных глазах всех обработанных мышей GC1KO и конгенных (+/+) контрольных мышей, вырабатываемые при 12 кд-ср/м<sup>2</sup>, усредняли в каждой временной точке и использовали для определения стандартных ошибок. Все данные переносили в программу Sigma Plot для окончательного графического представления. Стандартный t-тест был использован для расчета значений P между группами данных. Значимые различия были определены как значения P<0,05.

#### Биораспределение.

Распределение векторной ДНК в тканях обработанных мышей GC1KO определяли в образцах, собранных при умерщвлении, в соответствии с описанными ранее методами с незначительными модификациями (Jacobson et al., 2006). Обработанных вектором мышей умерщвляли в следующих временных точках: AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1-обработанных мышей (через 4 месяца после инъекции: n=1; 7 месяцев после инъекции: n=1), AAV5-smCBA-mGC1 (7 месяцев после инъекции: n=1; 10 месяцев после инъекции: n=5), AAV5-hGRK1-mGC1 (7 месяцев после инъекции: n=1; 10 месяцев после инъекции: n=1). Контрольные ткани из подобранных по возрасту мышей GC1KO для 7-месячного срока после инъекции или 10-месячного срока после инъекции также оценивали, помимо экспериментальных животных. После умерщвления были использованы особые, новые хирургические пинцеты для энуклеации обработанных и необработанных глаз, которые сохраняли приблизительно 0,5 см проксимального зрительного нерва. Затем были использованы особые, новые анатомические ножницы для удаления зрительных нервов из глазных яблок, после чего их быстро замораживали в жидком азоте и переносили на хранение при -80°C, где они оставались вплоть до момента экстракции ДНК. Глазные яблоки погружали в 4% параформальдегид (PAF) и подготавливали для иммуногистохимического анализа (см. ниже).

Мозги извлекали<sup>1</sup>, и коронарный мозговой матрикс из нержавеющей стали (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) использовали для выделения специфических зрительных зон. Правые и левые латеральные ядра колена собирали у одной мыши на обрабатываемую группу (в последней временной точке), фиксировали в формалине и сохраняли на случай, если векторные геномы будут найдены в мозгу и потребуется иммуногистохимия. Отдельные порции правого и левого мозга, содержащие зрительные пути, собирали, быстро замораживали в жидком азоте и переносили на хранение при -80°C, где они оставались вплоть до момента экстракции ДНК. Были приняты предосторожности во избежание взаимного загрязнения при сборе тканей. Геномную ДНК экстрагировали из тканей в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen DNeasy tissue kit). Результирующие концентрации ДНК определяли, используя биофотометр Eppendorf (Model 6131; Eppendorf, Hamburg, Germany). Количественные PCR проводили согласно описанным ранее методикам с незначительными модификациями (Jacobson et al., 2006; Song et al., 2002; Poirier et al., 2004).

Были созданы пары праймеров к сигнальной области полиаденилирования SV40 (SV40 polyA) в каждом векторном геноме, и построены стандартные кривые с использованием известных концентраций плазмидной ДНК, содержащей ту же самую последовательность-мишень SV40 polyA. Образцы ДНК анализировали в трех повторах. Чтобы исключить ложноотрицательные за счет ингибирования PCR, третий повтор "скрепляли" с плазмидной ДНК, содержащей мишень (SV40 polyA), в соотношении 100 копий/мкг геномной ДНК. Если детектировали >40 копий внесенной ДНК, образец считали приемлемым для передачи копий векторного генома. В некоторых случаях образцы, которые не удавалось "внести", анализировали повторно, используя в реакциях PCR менее чем 1 мкг геномной ДНК, таким образом добавляя ингибиторы PCR, вымываемые совместно с ДНК в экстрагированной ткани. Внесенное число копий уменьшалось пропорционально, чтобы поддерживать соотношение 100 копий/мкг ДНК. Критерии для передачи копий векторного генома были установлены в соответствии с описанными ранее методиками (Jacobson et al., 2006). Вкратце, более чем 100 копий генома/мкг считались положительными, а измененная копия считалась отрицательной.

#### Подготовка тканей, иммуногистохимия и микроскопия.

При умерщвлении одновременно с исследованиями биораспределения, предпринятыми через 7 месяцев после инъекции [AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1] и через 10 месяцев после инъекции (AAV5-smCBA-mGC1 и AAV5-hGRK1-mGC1), каемку глаза обработанных мышей GC1KO, подобранных по возрасту мышей, необработанных мышей GC1KO, а также подобранных по возрасту конгенных мышей GC1<sup>+/+</sup> маркировали нагретой иглой в положении 12 ч для облегчения ориентации. Необработанные мыши GC1KO и контрольные мыши GC1<sup>+/+</sup> были одного возраста с AAV8(Y733F)-обработанными мышами (8-месячные на момент умерщвления). Глаза, подготовленные для изготовления срезов из замороженных тканей, обрабатывали и осуществляли иммуноокрашивание в соответствии с описанными ранее методами (Haire et al., 2006). Вкратце, срезы сетчатки толщиной 10 мкм инкубировали с антителами

против GC1 (кроличьи поликлональные антитела, 1:200, sc-50512 Santa Cruz Biotechnology, USA) или мышиногo аррестина колбочек (кроличьи поликлональные антитела "LUMIj", 1:1000, предоставленные Dr. Cheryl Craft, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA). После первичной инкубации наносили вторичные IgG-антитела Alexa-488 или Alexa-594 соответственно, выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре (1:500 в 1X PBS). Срезы окрашивали контрастным красителем 4',6'-диамино-2-фенил-индолом (DAPI) в течение 5 мин при комнатной температуре. Через 11 месяцев после инъекции забивали одну мышь GC1KO, только один глаз которой обрабатывали конструкцией AAV5-smCBA-mGC1, и тотальные препараты сетчатки из обработанных и необработанных глаз подвергали обработке в соответствии с описанными ранее методами (Pang et al., 2010). Вкратце, тотальные препараты окрашивали антителами LUMIj (1:1000) с последующим окрашиванием вторичным IgG-антителом Alexa-594 (1:500 в 1X PBS) и располагали на покровном стекле микроскопа таким образом, чтобы самая верхняя (дорсальная) часть сетчатки была установлена в положение, соответствующее 12:00 ч. Срезы сетчатки изучали методом конфокальной микроскопии (спектральный конфокальный микроскоп Leica TCS SP2 AOBs, снабженный программным обеспечением LCS Version 2.61, Build 1537 software). Изображения были получены при установке одинаковой экспозиции и при 20× увеличении. Тотальные препараты сетчатки изучали в флуоресцентном микроскопе с окуляром широкого поля обзора (Zeiss AxioPlan 2), оборудованном камерой QImaging Retiga 4000R и программным обеспечением QImaging QCapture Pro software. Квадранты каждого тотального препарата были визуализированы при 10× при установке одинаковой экспозиции, после чего их вместе обрабатывали в программе Adobe Photoshop.

#### Иммуноблоттинг.

Через 7 месяцев после инъекции одну мышь, инъецированную конструкцией AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, и соответствующую ей по возрасту конгенную (контрольную) мышь GC1<sup>+/+</sup> умерщвляли, осуществляли энуклеацию их глаз, которые помещали в 1X PBS. Сетчатки немедленно рассекали и подготавливали следующим образом. Индивидуальные сетчатки солибилизовали в PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) с 1% Triton X-100 и полным протеиназным ингибитором (Roche) в течение 1 ч при 4°C с последующим центрифугированием при 14000 об/мин. Концентрацию белка в супернатанте определяли посредством BCA (Pierce) и по 15 мкг каждого образца разделяли на 12% полиакриламидном геле (Bio-Rad), и переносили на мембраны Immobilon-FL и выдерживали в течение 1 ч в гибридизационном буфере (25 мМ Tris, 192 мМ глицин), содержащем 15% метанола. Блоты обрабатывали блокирующим буфером (Li-Cor) и метили в течение 1 ч мышиним моноклональным антителом, распознающим GC1 (IS4, 1:3000, предоставленным Dr. Kris Palcwski, Case Western University, USA.), и продуцировали кроличьи поликлональные антитела против GCAP1 (pAb UW14, 1:25,000, предоставленные Dr. Wolfgang Baehr, University of Utah) и бета-актина (1:5000, Abcam). Наносили вторичные антитела (козьи антитела, полученные против Ig мыши, конъюгированного с CW800, и козьи, антикроличьи антитела, конъюгированные с IR680), выдерживали в течение 1 ч и блоты визуализировали с помощью системы Odyssey Infrared Imaging System (Licor, Lincoln, NE, USA).

Количественное определение мРНК посредством qPCR, извлечение генома сетчатки и иммуногистохимия зрительного нерва.

Индивидуально обработанные глаза с присоединенным зрительным нервом извлекали из мышей GC1KO через 1 год после обработки либо AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, либо AAV5-smCBA-mGC1, а также из подобранной по возрасту необработанной мыши GC1<sup>+/+</sup>. Сетчатки немедленно отсекали от глаз и быстро замораживали в жидком азоте. Зрительный нерв отделяли от глаз, фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи при 4°C, погружали в 30% раствор сахарозы и выдерживали в течение 2 ч при 4°C, затем быстро замораживали в криостатной смеси (Tissue Tek® OCT 4583; Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA) в бане с сухим льдом/этанолом. Делали срезы зрительных нервов толщиной 10 мкм и окрашивали их в соответствии с ранее описанными методами (Boye et al., 2010). Сетчатки гомогенизировали в 350 мкл буфера RLT (RNeasy® Protect Mini Kit, Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) плюс BME в течение 45 с. Образцы центрифугировали и лизат разделяли пополам (одна половина предназначалась для извлечения генома, а другая половина - для экстракции РНК) (Traint and Whitehead, 2009). Извлечение генома осуществляли так, как описано выше. Экстракцию РНК осуществляли с помощью набора RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Inc.). РНК подвергали обратной транскрипции (iScript® cDNA synthesis kit, Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) и использовали PCR в режиме реального времени (iQ SYBR® Green Supermix and MyiQ real-time PCR detection system interfaced with iCycler® thermal cycler, Biorad Laboratories), чтобы произвести количественное определение следующих специфических для сетчатки мРНК: гуанилатциклазы-1 (GC1), активирующего гуанилатциклазу белка-1 (GCAP1), α-трансдукцина колбочек (GNAT2), цГМФ-специфической альфа-субъединицы 3',5'-циклической фосфодиэстеразы (PDEба) и гена домашнего хозяйства, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Были идентифицированы пары праймеров для GCAP1, GNAT2, PDE $\alpha$  и GAPDH, к таковым, которые были использованы у Baehr et al. (2007). Праймеры для мышины GC1 (прямой праймер: 5'-GACCCTTCCTGCTGGTTTCGATCCA-3' [SEQ ID NO: 16], обратный праймер: 5'-CTGCATGTGTAGCAGCCTGTGCCTC-3' [SEQ ID NO: 17]) были сконструированы для фланкирующего экзона 5, участка полонки гена у GC1KOmouse (Yang et al., 1999), и был получен ампликон длиной в 151 п.н. Методом PCR получили ампликоны приемлемого размера в образцах сетчатки GC1<sup>+/+</sup>, а также AAV-mGC1-обработанной сетчатки GC1KO, но, как и ожидалось, не в необработанной сетчатке GC1KO. Идентичность ампликонов выверяли рестрикционным перевариванием под действием фермента StuI (NEB), который расщепляет внутреннюю область последовательности-мишени, с выходом фрагментов в 56 и 95 п.н. Метод PCR в режиме реального времени (rtPCR) с праймерами GC1 и GAPDH, при серийном разведении обратно транскрибированной ДНК (из обоих, GC1<sup>+/+</sup> и AAV-mGC1-обработанного, образцов сетчатки GC1KO), давал одинаковый наклон, что указывает на то, что праймеры GC1 являются подходящими для количественного определения как эндогенного, так и опосредованного вектором GC1-посредника (фиг. 20А и 20В).

Результаты усредняли по трем повторным реакциям и обсчитывали, используя метод 2- $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen, 2001) с использованием сигнала GAPDH, используемого для нормирования образцов, и образца GC1<sup>+/+</sup>, служащего в качестве калибратора. Стандартные отклонения рассчитывали из трех повторных реакций, проводимых для каждого образца. Данные представлены в виде кратного изменения в уровнях мРНК по отношению к образцу GC1<sup>+/+</sup>.

Результаты.

Длительная фоторецептор-специфическая экспрессия GC1.

Иммуноокрашивание антителом против GC1 выявило, что AAV-направленная экспрессия терапевтического белка, персистирует исключительно в фоторецепторах обработанных мышей GC1KO и в течение значительной части периода продолжительности жизни этих животных; в случае AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 - в течение по меньшей мере 7 месяцев, в случае AAV5-smCBA-mGC1 - в течение по меньшей мере 10 месяцев и в случае AAV5-hGRK1-mGC1 - в течение по меньшей мере 10 месяцев (фиг. 21А и 21В). Экспрессия GC1 была ограничена наружными сегментами палочек и колбочек, обработанных вектором AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, тогда как при обработке глаз вектором AAV5-smCBA-mGC1 она была обнаружена как в наружных сегментах, так и, хоть и реже, в тельцах фоторецепторных клеток - результат, сопоставимый с силой этого убиквитарного промотора по сравнению с фоторецептор-специфическим промотором, hGRK1 (Beltran et al., 2010). Рассматривали два примера утончения сетчатки. Первым примером была сетчатка GC1KO, обработанная вектором AAV5-smCBA-mGC1 (всего  $4,69 \times 10^9$  доставленных векторных геномов). Наружный ядерный слой (ONL) был слегка утончен относительно такового, наблюдаемого в сетчатках необработанных мышей GC1KO или в контрольных сетчатках GC1<sup>+/+</sup> (в обоих случаях мыши были в 8-месячном возрасте). Это может быть результатом повышенной экспрессии GC1, опосредованной промотором smCBA (Beltran et al., 2010).

Второй пример включал в себя сетчатку GC1KO, обработанную более концентрированным вектором AAV5-hGRK1-mGC1, и, как было показано ранее, фоторецептор-специфическую экспрессию GC1, но с более глубоким утончением наружного ядерного слоя. Следует отметить, что этот вектор был наиболее концентрированным из трех, которые были оценены в данном исследовании ( $4,12 \times 10^{10}$  доставленных векторных геномов по сравнению с  $4,69 \times 10^9$  и  $1,08 \times 10^{10}$  соответственно для векторов AAV5-smCBA-mGC1 и AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1), и опять нужно отметить, что повышенная экспрессия GC1 может быть причиной наблюдаемого утончения. Эти результаты по меньшей мере свидетельствуют о том, что у этих мышей может наблюдаться дозолимитирующая токсичность. Экспрессия GC1 отсутствовала в сетчатке мышей GC1KO (фиг. 21А и 21В).

Длительная выживаемость колбочковидных фоторецепторов достигается с помощью AAV-направленной GC1.

Колбочковидные фоторецепторы у обработанных и необработанных мышей GC1KO, а также у контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup> были идентифицированы путем окрашивания на предмет обнаружения аррестина на колбочках. Изучали поперечные срезы сетчатки мышей, умерщвленных для исследования конечного биораспределения и тотальных препаратов сетчатки из глаз мышей GC1KO через 11 месяцев после обработки вектором AAV5-smCBA-mGC1 (только правого глаза). Здесь было показано, что плотность колбочковидных фоторецепторов была значительно снижена в необработанных сетчатках мышей GC1KO к 10-месячному сроку их жизни, и это подтверждает прежние сообщения о том, что у этой мышины модели происходит топографически специфическая утрата колбочек (Coleman et al., 2004) (фиг. 21А и 21В). Путем анализа тотальных препаратов сетчатки мышей 11-месячного возраста было выявлено, что в необработанных сетчатках плотность колбочек очень снижена, с остаточными колбочками, обнаруживаемыми исключительно в самых верхних областях сетчатки, тогда как в парной, P14-обработанной сетчатке, повсеместно, за исключением малого пятна темпоральной ретины, которая, по всей видимости, оказалась не охваченной вектором во время субретинальной инъекции и поэтому не содержала трансгенного

продукта, сохранялась значительно более высокая плотность колбочек. По сравнению с картиной, наблюдаемой в AAV5-обработанных сетчатках, плотность и структура колбочек на поперечных срезах сетчатки AAV8(Y733F)-обработанных мышей выглядела качественно наиболее схожей с таковой, наблюдаемой в нормальной сетчатке мышей GC1 (фиг. 21А и 21В). Тогда как плотности колбочек были выше, чем в необработанных контрольных сетчатках, однако сами колбочки в AAV5-обработанных сетчатках выглядели несколько дезорганизованными - результат, который, скорее всего, можно объяснить некоторым общим беспорядком/уточнением наружных ядерных слоев у этих мышей.

Долгосрочное восстановление функции фоторецептора (ERG) у AAV-обработанных мышей GC1KO.

В предыдущих примерах опосредованную колбочками функцию можно было восстановить у мышей GC1KO в течение 3 месяцев после P14-доставки им вектора AAV5-smCBA-mGC1 или AAV5-hGRK1-mGC1 (Boye et al., 2010). Средние амплитуды фотопических бета-волн у обработанных мышей были частично восстановлены через 4 недели после инъекции и стабильно сохранялись в течение всего периода данного исследования. В данном примере сравнивали опосредованные колбочками реакции, наблюдаемые после окончания 9-месячного срока после обработки, с таковыми у мышей GC1KO, которых инъецировали в сроки между P14 и P25 идентичными векторами, которые были использованы в предыдущем исследовании. У всех остальных мышей, обработанных вектором AAV5-mGC1, по меньшей мере свыше 1 года после обработки продолжала проявляться поддающаяся измерению опосредованная колбочками функция. Репрезентативные картины электроретинограмм, полученные при 12 кд-ср/м<sup>2</sup> от отдельных мышей, обработанных вектором AAV5-hGRK1-mGC1, представлены на фиг. 22А и 22В. Реакции колбочек были стабильными во времени и были значительно выше реакций, обнаруживаемых в необработанных контралатеральных контролях ( $p < 0,001$ ), что и предполагает, что восстановление функции колбочек в процессе жизни указанных животных возможно (фиг. 22А). В соответствии с предыдущим примером уровень восстановления, достигаемый после доставки вектора, содержащего фоторецептор-специфический промотор (hGRK1), в любой период после обработки незначительно отличался от такового, достигаемого при использовании вектора, содержащего убиквитарный промотор (smCBA). Репрезентативные картины электроретинограмм позволили выявить, что кинетика восстановленной ERG колбочек выглядела нормальной на всем протяжении исследования (фиг. 22В). Кроме того, в этом примере было показано, что восстановление функции колбочковидного фоторецептора было стабильным в течение по меньшей мере 6 месяцев после инъекции вектора AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1.

Амплитуды бета-волн колбочек у мышей GC1KO, которым инъецировали этот сильный, быстродействующий AAV8, капсидный мутант по тирозину, были выше таковых, наблюдаемых у мышей GC1KO, которым инъецировали любой из векторов AAV5 на любом сроке в процессе проведения исследования. Через 6 месяцев после обработки в последней временной точке, когда могло быть проведено параллельное сравнение действия всех векторов, наблюдалась существенная разница между амплитудами бета-волн колбочек в случае AAV8(Y733)-hGRK1-mGC1-обработанных по сравнению с AAV5-hGRK1-mGC1-обработанными мышами ( $p = 0,033$ ) и в случае AAV(Y733F)-hGRK1-mGC1 - по сравнению с AAV5-smCBA-mGC1-обработанными мышами ( $p = 0,025$ ). Репрезентативная картина электроретинограммы, полученной через 9 месяцев после инъекции вектора AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 ( $n = 1$ ), была значительно слабее таковой, полученной через 6 месяцев после инъекции.

В силу вариабельности в реакциях палочек между необработанными мышами GC1KO (от 50 до 70% у мышей WT в возрасте 5 месяцев (23)) статистическое сравнение средних показателей ответов палочек глаз обработанных мышей с таковыми необработанных является проблематичным. Однако амплитуды ERG палочек контралатеральных глаз одного и того же животного являются почти одинаковыми, поэтому здесь считали среднее (между глазами одной и той же мыши) отношение амплитуд альфа-волн и бета-волн палочек по сравнению с необработанными глазами, затем указанные отношения наносили на график в зависимости от времени (фиг. 23А и 23В). AAV-опосредованное восстановление функции палочек показано в виде отношений величиной  $> 1,0$ . На фиг. 23А и 23В показано, что, за исключением одной временной точки (4 месяца после обработки), все средние отношения амплитуд бета-волн палочек в случае AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1-обработанных к таковым необработанных глаз  $> 1,0$ . Отношения AAV5-обработанных к необработанным глазам только иногда было  $> 1,0$ . Сходным образом, отношения амплитуд альфа-волн палочек было неизменно выше у AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1-обработанных мышей, тогда как они часто ухудшались после обработки каким-нибудь из AAV5-векторов (фиг. 23В). Полученные результаты свидетельствуют, что, хотя терапевтический эффект в отношении палочек и был стабильным, вектор AAV8(Y733F) придавал мышам GC1KO наиболее стойкое опосредованное палочками функциональное улучшение (фиг. 23В). Репрезентативные опосредованные палочками скотопические картины ERG в ответ на стимул в 1 кд-ср/м<sup>2</sup> были продемонстрированы у AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1-обработанных мышей GC1KO 4 (через 6 месяцев после обработки), в контрольном контралатеральном глазу необработанных животных и у подобранных по возрасту контрольных животных GC1<sup>+/+</sup>. AAV8(Y733F)-опосредованные улучшения амплитуд ERG палочек ясно видны в данном эксперименте, и они указывают на то, что кроме амплитуд суб-дикого типа, кинетика реакций обработанных глаз сходна

с таковой, наблюдаемой в контроле GC1<sup>+/+</sup>.

Биораспределение векторов.

Исследования по биораспределению были предприняты у мышей GC1KO, обработанных каждым из векторов, с целью установления того, возможно ли детектирование AAV5- или AAV8(Y733F)-доставленных векторных геномов в зрительных нервах и/или в мозгу обработанных мышей по прошествии месячного периода. Мышей, которым инъецировали векторы AAV5, оценивали через 7 (n=2) и 10 (n=5) месяцев после обработки, а мышей, которым инъецировали AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1, оценивали через 4 (n=1) и 7 (n=1) месяцев после обработки. Изучали зрительные нервы в инъецированных и неинъецированных глазах, а также участки левого и правого мозга, которые содержат зрительные пути. Векторы AAV5 инъецировали в правый глаз мышей GC1KO. Соответственно, векторные геномы детектировали в правом зрительном нерве AAV5-обработанных мышей через 7 и через 10 месяцев после инъекции. Через 7 месяцев после инъекции векторные геномы детектировали также и в левом мозгу одной из мышей, которой инъецировали AAV5-hGRK1-mGC1. У этого животного в правом мозгу векторные геномы отсутствовали. Наблюдение, что правый (инъецированный) зрительный нерв и левый мозг были положительны, анатомически совместимо, поскольку левая полусфера преимущественно "соединена" с правым глазом.

Через 10 месяцев после инъекции AAV5-доставленные векторные геномы все еще детектировались в правом (инъецированном) зрительном нерве, но отсутствовали в обеих полусферах мозга. Вектор AAV8(Y733) инъецировали в левый глаз мышей GC1KO. Соответственно, AAV8(Y733F)-доставленные векторные геномы детектировали в левом зрительном нерве как через 4, так и через 7 месяцев после инъекции. Ни в одной из временных точек векторные геномы у мышей, обработанных AAV8(733), не детектировались ни в одной из полусфер мозга. В среднем большее число векторных геномов было детектировано в зрительных нервах глаз, в которые инъецировали вектор AAV5-GRK1-mGC1, по сравнению с таковыми, в которые инъецировали вектор AAV5-smCBA-mGC1. Этот результат, скорее всего, объясняется более высоким титром первого ( $4,12 \times 10^{13}$  вг/мл) по сравнению со вторым ( $4,69 \times 10^{12}$  вг/мл).

Кроме того, только AAVS-hGRK1-mGC1-доставленные геномы детектировались в тканях мозга после окончания срока проведения настоящего исследования, и это еще одно наблюдение, которое, вероятнее всего, объясняется более высоким титром указанного вектора. Несмотря на тот факт, что использованный титр вектора AAV8 (Y733F)-hGRK1-mGC1 ( $1,08 \times 10^{13}$  вг/мл) был меньше такового в случае вектора AAV5-hGRK1-mGC1, более высокое в среднем число векторных геномов было детектировано в зрительных нервах глаз, обработанных вектором AAV8(Y733F). Несмотря на то, что было известно, что вектор AAV5 является неэффективным для преобразования ганглиоцитов сетчатки мышей (Stieger et al., 2008), было показано, что AAV8 осуществляет трансдукцию клеток этого типа (Jacobson et al., 2006). Некоторое воздействие вектора на клетки сетчатки не является неожиданным, поскольку в процессе субретинальной инъекции шприц пронизывает внутреннюю сетчатку и поскольку у мышей отношение объема инъекции к общему объему глаза выше. Следовательно, обнаруженное наибольшее количество векторных геномов в зрительных нервах AAV8(Y733F)-обработанных глаз можно объяснить повышенной в отношении ганглиоцитов сетчатки аффинностью вектора AAV8(Y733F) по сравнению с вектором AAV5. Как и ожидалось, никаких следов геномов вектора AAV не было обнаружено в тканях интактных контрольных мышей GC1KO.

Обработка вектором AAV-mGC1 восстанавливает уровни GC1 и GCAP1 до уровней дикого типа в обработанной сетчатке мышей GC1KO.

Через 7 месяцев после инъекции вектора AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1 обработанные и необработанные одной мыши GC1KO и одной подобранной по возрасту контрольной мыши GC1<sup>+/+</sup> использовали для изучения уровней экспрессии белков GC1 и GCAP1. Целью данного эксперимента было не сравнение уровней GC1 в обработанных группах животных, а, скорее, сравнение уровней вектор-опосредованной экспрессии GC1 с уровнями GC1 у животных дикого типа. Сходным образом авторы изобретения оценивали эффекты AAV-доставленной гуанилатциклазы-1 на экспрессию белка GCAP1. Как и ожидалось, фермент GC1 отсутствовал в необработанном глазу мыши GC1KO. И наоборот, уровни GC1 в AAV8(Y733F)-обработанном глазу приближались к таковым, наблюдаемым в норме в контроле GC1<sup>+/+</sup> (фиг. 4). В соответствии с более ранними сообщениями о том, что постнатально у мышей GC1KO происходит отрицательная регуляция GCAP1, авторы изобретения показали, что в необработанной сетчатке мышей GC1KO происходила отрицательная регуляция GCAP1 по сравнению с контрольной GC1<sup>+/+</sup> (39). Однако AAV8(Y733F)-опосредованная доставка GC1 приводит к повышению регуляции экспрессии GCAP1 в обработанной сетчатке мышей GC1KO. Уровни экспрессии белка GCAP1 также были сравнимы с уровнем, наблюдаемым у контрольных животных GC1<sup>+/+</sup>.

У обработанных мышей GC1KO присутствует мРНК GC1, а уровни мРНК GNAT2 повышены в сравнении с мышами GC1KO. С помощью пары праймеров GC1, которая фланкирует нарушение гена неомидина, локализованное внутри экзона 5 у мышей GC1KO (Timmers et al., 2001), оказалось возможно измерить уровень мРНК GC1 как у GC1<sup>+/+</sup>, так и у обработанных вектором мышей GC1KO. Интересно, что вторая пара праймеров GC1, нацеленная на экзон 18 и 19 фермента GC1, расположена существенно

ниже нарушения гена, продуцируемого продуктом PCR в необработанном образце мышей GC1KO, и, следовательно, эти праймеры не используются. Через один год после обработки уровни мРНК в обработанных сетчатках были приблизительно в 7 раз (у AAV5-обработанных) и в 14 раз [у AAV8(Y733F)-обработанных] выше, чем у подобранных по возрасту контрольных мышей GC1<sup>+/+</sup> (фиг. 24А и 24В). Используя технологию восстановления нуклеиновых кислот, которая дает возможность равномерного разделения образца на две равные половины, одну для экстракции РНК, а другую для ДНК (Pang et al., 2011), измерили уровни мРНК и определили число векторных геномов внутри одного и того же образца. Было обнаружено, что высокие уровни мРНК GC1 в обработанных сетчатках соответствовали восстановлению многих векторных геномов;  $1,57 \times 10^7$  векторных геномов/мкг ДНК в случае AAV8(Y733F) и  $4,7 \times 10^6$  векторных геномов/мкг в случае AAV5. Несмотря на высокие уровни мРНК GC1 в обработанных сетчатках, никакой экспрессии GC1 не было обнаружено в зрительных нервах обработанных глаз. Такой результат дополнительно подтверждает представление, что векторы, которые были оценены в настоящем исследовании, не приводили к тому, чтобы экспрессия трансгена происходила вне мишени, на которую был направлен вектор. В соответствии с более ранними сообщениями о том, что редукция GCAP1 у мышей GC1KO является посттрансляционной (т.е. уровни мРНК являются неизменными), авторы изобретения не обнаружили существенного изменения от образца к образцу в уровнях мРНК GCAP1 (фиг. 24А и 24В).

В качестве начальной оценки обработки по другим специфическим РНК колбочек в этих образцах было оценено также и несколько других транскриптов. Для установления базового уровня для уровней трансдукция  $\alpha$  (GNAT2) РНК GNAT2 оценивали в необработанных образцах GC1KO и обнаружили, что ее уровень снижен по сравнению с таковым в контроле GC1<sup>+/+</sup>, - результат, вероятнее всего, связанный с утратой колбочковидных фоторецепторов в этих сетчатках (фиг. 24А и 24В). И наоборот, имело место повышение уровней мРНК GNAT2 в глазах, обработанных либо вектором AAV5, либо вектором AAV8(Y733F), - результат, который дополнительно подтверждает представление, что колбочковидные фоторецепторы защищены у мышей GC1KO, обработанных вектором AAV-mGC1. Уровни PDE6a в палочках были относительно неизменными от образца к образцу, вероятно, в силу того, что колбочковидные фоторецепторы у мышей GC1KO не подвергаются дегенерации (фиг. 24А и 24В).

В заключение, описанные здесь исследования показывают, что персистентная AAV-опосредованная экспрессия GC1 способна на долгий период восстанавливать функцию сетчатки и защищать колбочковидные фоторецепторы у мышей GC1KO. Когорты AAV5- и AAV8(Y733F)-обработанных мышей GC1KO были оценены в отношении ERG в течение 9 и 6 месяцев после инъекции соответственно. Хотя статистическое сравнение амплитуд ERG не продолжали проводить после временных точек в силу сокращения количества образцов, у всех обработанных мышей функциональное восстановление (ERG) продолжалось. Различные анализы, предпринятые на подгруппах указанных оставшихся мышей, однозначно указывали на продолжающееся терапевтическое воздействие. Указанное продолжительное терапевтическое воздействие подтверждалось на целом ряде различных уровней: 1) нахождение белка GC1 в обработанных глазах через 10 месяцев после обработки, 2) восстановление функции колбочек, измеряемое посредством ERG, через 12 месяцев после обработки, 3) повышенная выживаемость колбочек в обработанных глазах через 11 месяцев после обработки и 4) нахождение векторных геномов и мРНК GC1 в сетчатках через 12 месяцев после обработки. Если рассматривать в индивидуальном порядке, дискретные анализы, число используемых в таком анализе образцов было часто мало. Однако, когда все результаты этих анализов коррелировали с терапевтической эффективностью у мышей, проявляющих четкие признаки функционального восстановления, малое число образцов значительно повышало эффективность полученных результатов. Следовательно, в данном контексте очевидно, что терапевтический эффект распространяется и за пределы периода статистической оценки восстановления ERG. Это является первой демонстрацией долговременной терапии дефицита GC1 у животных моделей.

Восстановленные ERG колбочек наблюдались у AAV5- и AAV8(Y733)-обработанных мышей GC1KO соответственно в течение по меньшей мере 9 и 6 месяцев после обработки. Реакции были стабильными и значительно более высокими, чем реакции колбочек мышей GC1KO, на всем протяжении периода проведения настоящего исследования. Восстановление было наиболее выраженным у мышей, обработанных вектором AAV8(Y733F). Средние амплитуды бета-волн колбочек у AAV8(Y733F)-обработанных мышей систематически приблизительно на 20 мкВ превышали таковые, регистрируемые у мышей GC1KO, обработанных стандартными векторами AAV5 (~55 и ~35 мкВ соответственно). Через 6 месяцев после обработки, последней временной точки, когда статистически сравнивали все векторы, указанная разница оставалась значимой. Этот результат подтверждает, что вектор AAV8(Y733F) стабильно восстанавливал структуру и функцию сетчатки у мыши rd10, модели, резистентной к лечению стандартными векторами AAV.

Определение количественных различий в амплитудах палочек между обработанными и необработанными глазами у мыши GC1KO является проблематичным в силу того, что у этой модели функция палочек частично поддерживается гуанилатциклазой-2 (GC2) (Sun et al., 2010). Поэтому реакции палочек на уровне ERG от животного к животному варьируют (от 30 до 50% от нормального). Следовательно, в

отличие от случая, когда сравнивают реакции обработанных и необработанных колбочек, реакции обработанных палочек нельзя сравнивать с нулевым базовым уровнем. Тем не менее, парные глаза GC1KO имеют сравнимые амплитуды ERG палочек, и сравнение отношения показателей ERG палочек парных глаз одного и того же животного, один из которых обработан, а другой не обработан, обеспечивает обоснованный показатель для оценки эффектов лечения по функции палочек. Улучшение опосредованных палочками реакций у мышей GC1KO, обработанных вектором AAV8(Y733F), наблюдалось более систематически, чем таковое, регистрируемое у AAV5-обработанных мышей, как определялось при сравнении внутри-индивидуального отношения амплитуд альфа- и бета-волн палочек из обработанного и необработанного глаза. Это предполагает, что агрессивная экспрессия GC1 в глазу мыши GC1KO может дополнять частичный эффект GC2 в отношении функции палочек у мышей.

Долгосрочная выживаемость колбочковидных фоторецепторов (11 месяцев после инъекции) была продемонстрирована иммуноокрашиванием обработанных и необработанных тотальных препаратов сетчатки от одной мыши, обработанной вектором AAV5-smCBA-mGC1, антителом против аррестина сетчатки. Колбочки были идентифицированы во всем препарате обработанной сетчатки мыши GC1KO. Совершенно определено также и то, что AAV5-smCBA-mGC1-обработанная сетчатка содержала больше колбочек, чем в необработанном глазу, что согласуется с данными прежних публикаций, при этом в необработанном глазу сохранялась лишь малая фракция колбочек в его самой верхней полусфере (Provost et al., 2005). Несмотря на то, что сохраненные колбочки в обработанной сетчатке мышей GC1KO на ультраструктурном уровне не исследовались (например, методом электронной микроскопии), наблюдаемое на уровне анализа ERG сохранение функциональной активности колбочек во времени свидетельствует о том, что их структура оставалась интактной. Долгосрочная защита колбочковидных фоторецепторов, опосредованная терапевтическим вектором AAV-GC1, имеет очевидную клиническую значимость, поскольку свидетельствует о потенциальной возможности защитить колбочки желтого пятна и восстановить пригодный уровень дневного/цветного зрения пациентам с дефицитом GC1.

AAV-опосредованная экспрессия GC1 персистировала по меньшей мере в течение 10 месяцев после обработки (последняя временная точка, в которой проводилась иммуногистохимическая оценка) и была локализована исключительно в фоторецепторах, независимо от используемого серотипа или от того, направлялась ли эта экспрессия фоторецептор-специфическим (hGRK1) или убиквитарным (smCBA) промотором. Наряду с тем, что экспрессия трансгена была ограничена типом клеток-мишеней, промотор hGRK1 был более специфичен в том отношении, что он направлял экспрессию исключительно внутри адекватного компартмента клеток-мишеней (в наружных сегментах фоторецепторов). Этот результат, наряду с другими удачными исследованиями с целью подтверждения правильности концепции применения указанного промотора, свидетельствует о том, что промотор hGRK1 следует принимать во внимание при создании клинического вектора AAV, нацеленного на фоторецепторы.

Иммуноокрашивание срезов сетчатки трансгенных мышей GC1KO через 10 месяцев после обработки вектором AAV5-smCBA-mGC1 позволило выявить умеренное истончение ONL по сравнению с таковым у мышей дикого типа и необработанных контрольных мышей GC1KO. Кроме того, в сетчатке белок GC1 эпизодически обнаруживался в клеточных тельцах фоторецепторов. Возможно, что сильный убиквитарный промотор smCBA направлял экспрессию GC1 на таком уровне, который превосходил возможности системы некоторых фоторецепторов, и что накопление трансгенного продукта в клеточных тельцах фоторецепторов вызывало инициированный стрессом апоптоз указанных клеток. Более драматичное истончение ONL наблюдалось у одной мыши, которой инъецировали вектор AAV5-hGRK1-mGC1. Когда  $n$  равно 1, нельзя с определенностью заключить, что истончение сетчатки имело место у всех мышей, обработанных таким вектором. Тем не менее, в соответствии с представлениями о токсичности при избыточной экспрессии следует отметить, что титр вектора AAV5-hGRK1-mGC1 был наиболее высоким среди трех векторов, оцениваемых в настоящем исследовании. Однако следует также отметить, что не было никакого накопления белка GC1 в клеточных тельцах фоторецепторов с высоким титром вектора AAV5-hGRK1-mGC1.

Несмотря на исключительно фоторецепторную природу AAV-опосредованной экспрессии GC1, авторов настоящего изобретения интересовала оценка распределения векторных геномов в тканях, расположенных вне субретинального пространства. Важно то, что эти данные были получены на "заболевших" животных. Это имеет значение, поскольку доказано, что характер векторной трансдукции в больной сетчатке отличается от такового в здоровой (Kolstad et al., 2010). Это дает основания предполагать, что картины биораспределения также могут быть разными. По этой причине важно было оценить распределение векторных геномов внутри спасенной животной модели как таковой (т.е. в организме субъектов, у которых проявилось четкое восстановление электроретинограмм). Хотя число образцов было ограничено, была собрана полезная информация о распределении AAV5- и AAV8(Y733F)-доставленных геномах в зрительном нерве и в мозгу.

Это является первой оценкой биораспределения вектора AAV, содержащего экспонированную на поверхности капсида тирозиновую мутацию. AAV5- и AAV8(Y733F)-доставленные векторные геномы обнаруживались в зрительных нервах обработанных глаз во всех исследованных временных точках. Только в одной временной точке (через 7 месяцев после инъекции) AAV5-векторные геномы были обна-

ружены в мозгу обработанной мыши GC1KO. Геномы были обнаружены только в полусфере, противоположной тому глазу, в который была произведена инъекция. Этот результат противоречит тому, что было обнаружено Provost et al., 2005, которые сообщали об отсутствии AAV5-доставленной последовательности в мозгу субретинально инъецированных крыс и собак. Через 10 месяцев после инъекции никаких векторных геномов как из мозга мышей GC1KO, обработанных AAV5, так и из мозга мышей, обработанных вектором AAV8(Y733F), ни в одной временной точке получено не было. Однако в силу относительно малого количества анализируемых мышей нельзя однозначно исключить возможность того, что AAV5-доставленные геномы присутствуют в мозгу через 7 месяцев после инъекции или что AAV8(Y733F)-доставленные геномы никогда не присутствуют в мозгу обработанных мышей GC1KO.

Несмотря на получение векторных геномов из зрительных нервов глаз, иммуноокрашивание позволило выявить отсутствие экспрессии GC1 в зрительных нервах глаз, обработанных векторами AAV5-smCBA-mGC1 или AAV8(Y733F)-hGRK1-mGC1. В более раннем исследовании Stieger et al., (2005) была обнаружена экспрессия трансгена в зрительных нервах и в мозгу крыс и собак через 2 месяца и через 4 недели после субретинальной инъекции AAV8, содержащего зеленый флуоресцирующий белок (GFP). Если принять во внимание, что вектор AAV8(Y733F) содержал фоторецептор-специфический промотор hGRK1, а также обнаруженный ранее факт, что экспрессия GC1 ограничена фоторецепторами даже под контролем убиквитарного промотора, такого как smCBA, отсутствие экспрессии GC1 в зрительных нервах не покажется неожиданным. Stieger et al., (2005) встраивали в свой вектор сильный убиквитарный промотор CMV, чтобы направить экспрессию GFP, белка, который способен стабильно экспрессироваться во многих тканях при доставке посредством вирусных векторов.

Наряду с тем, что векторы AAV5 и AAV8 (Y733F) способны обеспечивать долгосрочную терапию мышей GC1KO, можно заметить очевидные преимущества, ассоциированные с применением вектора AAV8(Y733F). Первое и наиболее важное - вектор AAV8(Y733F) с фоторецептор-специфическим промотором придает значительно более высокую ERG-реактивность колбочкам обработанных им животных, чем любой из векторов AAV5. Причина этого может быть связана со способностью векторов AAV8 к трансдукции участков, лежащих снаружи инъецируемого пузырька жидкости в сетчатке грызунов, тогда как область сетчатки, преобразованная вектором AAV5, остается по большей части примыкающей к указанному пузырьку (47). Таким образом, AAV8(733F) может осуществлять трансдукцию в среднем более обширной области сетчатки по сравнению с векторами AAV5 и последовательно осуществлять трансдукцию все большего количества колбочек и вызывать сильную ERG-реакцию колбочек по всему полю за счет повышенной общей выживаемости колбочек и/или за счет повышенного уровня реакции на свет каждой из трансдуцированных колбочек либо за счет и того, и другого.

Пример 8. Иллюстративные полипептидные последовательности GC1 млекопитающих.

Иллюстративные аминокислотные последовательности, используемые на практике настоящего изобретения, включают в себя, без ограничения, одну или несколько аминокислотных последовательностей, которые кодируют биологически активный гуанилатциклазный белок млекопитающих. Такие последовательности включают в себя, без ограничения, последовательности человека, всех приматов, кроме человека, мышинные, бычьи и собачьи последовательности, такие как последовательности гуанилатциклазных белков, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, приведенных здесь ниже:

*Homo sapiens* (человек; номер доступа в GenPept: NP 000171)

MTACARRAGGLPDPGLCGPAWAPSLPRLPRALPRLPLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLPWPACDP  
 IFSRARPDLAARLAARLNDRPGLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAA  
 CRPAELLAAEEAGIALVPWGCPTQAEGETTAPAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWEAG  
 RSLSTALRARGLPVAVSMTSEPLDLSGAREALRKVRDGRVTVAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAE  
 ELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAAANSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRRAQE  
 RRELPSDLNLQVSPFLFGTIYDAVFLLAGVVAEAAAAGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGLDGG  
 DEEPPFVLLDADAAGDRLFATYMLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSCFWDPNNICGGGLE  
 PGLVFLGFLLVGMGLAGAFLAHYVRHRLHMQMVSGPNKIILTVDITFLHHPGGTSRKVAQGSR  
 SSLGARSMSDIRSGPSQHLDSFNIGVYEGDRVWLKFFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVAL  
 YLGLFLARGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLLQDLAQREIKLDWMFKSLLLDLIGIRYLHHR  
 GVAHGRKLSRNCIVDGRFVLKITDHGHRLLLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLA  
 GDVFSLAIMQEVVCRSAPYAMLELTPPEEVQVRVSPPLCRPLVSMQAPVECIILMKQCWAEQP  
 ELRPSMDHTFDLTKNINKRKTNIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEELEKQKQKTRDRLTQMLP  
 PSVAEALKTGTPVEPEYFQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDVYK  
 ETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPVPRIRIGLHSGPCVAGVVG  
 LTMPTRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVIGILRALDSGYQVELRGRTELKKGKGAEDTFLW  
 VGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQEIIPERRRKKLEKARPGQFS (SEQ ID NO:1)

*Mus musculus* (мышь; номер доступа в GenPept: NP 032218)

MSAWLLPAGGLPGAGFCVPARQSPSFSRVLRWPRPGLPGLLLLLLLLSPSALSAVFKVGVLPWA  
 CDPFIFARARPDLAARLAANLNDRFDALDGGPRFEVALLPEPCLTPGSLGAVSSALSRVSGLVGPVN  
 PAACRPAELLAQAEAGVALVPWGCPTQAEGETTAPAVTPAADALYVLLRAFRWARVALITAPQDLWV  
 EAGRALSTALRARGLPVALVTSMETSDRSGAREALGRIRDGRVTVAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLE  
 AAEELALTDGSLVFLPFDTLHYALSPPGPEALAAAFVNSQLRRAHDAVLTLTRRCPGGSVQDSLRR  
 AQEHQELPLDLNLKQVSPFLFGTIYDAVFLLAGGVKRARTAVGGGWVSGASVARQVREAQVSGFCGV  
 LGRTEEPSFVLLDADAAGEQLFATHLLDPVLSLSAGTSMHFPGRGPAAPGPDPSCFWDPDVIENG  
 GVEPGLVFGVFLLVIGMGLTGAFLAHLRHLHMQMASGPNKIILTLEDVTFHHPGGSSRKVVQ  
 GSRSSLATRSASDIRSVPSQPQESTNGLYEGDWVWLKFFPGEHMAIRPATKTAFSKLRELHREN  
 VALYLGLFLAGTADSPATPGEGLAVVSEHCARGSLHDLAQREIKLDWMFKSLLLDLIGMRYL  
 HHRGVVAHGRKLSRNCVVDGRFVLKVDHGHGRLLLEAQKVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERRG  
 TLAGDVFSLAIMQEVVCRSTPYAMLELTPPEVIQVRVSPPLCRPLVSMQAPMECIQLMTQCWA  
 EHPPELPSMDLTFDLFKSINKRKTNIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEELEKQKQKTRDRLTQ  
 MLPPSVAEALKMGTSVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGAHV  
 YKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGSFRMRHMPVPRIRIGLHSGPCVAG  
 VVGLTMPTRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVIRILRALDQGFQMECRGRTELKKGKGIEDT  
 YWLVGRGLGFNKPPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIIPERRRKKLEKARPGQFTGK (SEQ ID NO:2)

*Rattus norvegicus* (норвежская крыса; номер доступа в GenPept: NP 077356)

MSAWLLPAGGFPAGFCIPAWQSRSSLSRVLRWPGPGLPGLLLLLLLLSPSASFSAVFKVGVLPWA  
 CDPFIFARARPDLAARLATDRNLNDRDLALDGGPWFEVTLPEPCLTPGSLGAVSSALTRVSGLVGPVN  
 PAACRPAELLAQAEAGVALVPWGCPTQAEGETTAPAVTPAADALYVLLKAFWARVALITAPQDLWV  
 EAGRALSTALRARGLPVALVTSMPVSDLSGAREALRRIRDGRVTVAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLE  
 AAEELGLTDGSLVFLPFDTLHYALSPPGPEALAAAFVNSQLRRAHDAVLTLTRRCPGGSVQDSLRR  
 AQEHQELPLDLNLKQVSPFLFGTIYDAVFLLAGGVTRARAAGGWVSGASVARQVREAQVSGFCGI  
 LGRTEEPSFVLLDADAAGERLFTTHLLDPVLSLSAGTPVHFPGRGAPAPGPDPSCFWDPDVIENG  
 GVEPGLVFGVFLLVIVVGLTGAFLAHLRHLHMQMVSGPNKIILTLEDVTFHHPQGGSSRKVAQ  
 GSRSSLATRSASDIRSVPSQPQESTNGLYEGDWVWLKFFPGEHMAIRPATKMAFSKLRELHREN  
 VALYLGLFLAGTADSPATPGEGLAVVSEHCARGSLHDLAQREIKLDWMFKSLLLDLIGMRYL  
 HHRGVVAHGRKLSRNCVVDGRFVLKVDHGHGRLLLEAQKVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERRG  
 TLAGDVFSLGIIMQEVVCRSTPYAMLELTPPEVIQVRVSPPLCRPLVSMQAPMECIQLMAQCWA  
 EHPPELPSMDLTFDLFKGINKRKTNIIDSMRLMEQYSSNLEDLIRERTEELEKQKQKTRDRLTQ  
 MLPPSVAEALKMGTSVEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHDV  
 YKVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSAVGSFRMRHMPVPRIRIGLHSGPCVAG  
 VVGLTMPTRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVIRILRALDQGFQMECRGRTELKKGKVEDT  
 YWLVGRVGFNKPPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIIPERRRKKLEKARPGQFTGK (SEQ ID NO:3)

*Bos taurus* GCl (бык; номер доступа в GenPept: NP 776973)

MTACTFLAGGLRDPGLCAPTRWSPPGLPPIPPRRLRLRPPLLLLLLPRSVLSAVFTVGLVGP  
 WACDPIFARARPDLAARLAASRLNHAALLEGGRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALTRVSGLVGP  
 VNPAAACRPAELLAQEAGVALVPWGCPCGTRAGGTTAPVVTAAADALYALLRAFRWAHVALVTAQDL  
 WVEAGHALSTALRARGLPVALVTSMEPSDLSGAREALRRVQDGRVRAVIMVMHVSLLGGEEQRCL  
 LEAAEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPDALAVLANSSQLRKAHDAVLTTRHCPGGSVRDSL  
 RRAQEHRELPLDLNLQVSPFLFGTYDVSFLLAGGVARARVAAGGGVWVSGAAVARHIRDARVPGFC  
 GALGGAEPSFVLLDTDATGDQLFATYVLDPTQGFHFSAGTPVHFVFKGGGPGPDPSCWFDPTIC  
 NGGVEPSVVFIFGLLVGMGLAGAFLAHYCRHRLHHIQMVSGPNKIILTDDITFLPHGGNSRKV  
 AQQSRTSLAARSISDVRSIHSQLPDYTNIGLYEGDWWLKKFPGDRHIAIRPATKMAFSKIRELRH  
 ENVALYLGLFLAGGAGGPAAPGEGVLAVVSEHCARGSLQDQLLAQRDIKLDWMFKSSLLLDLIGKIR  
 YLHHRGVAGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHRLLLEAQRVLEPPSAEDQLWTAPELLRDPVLER  
 RGTLAGDVVSLGIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVKRVQSPPLCRPSVSIQAPMECIQLMKQC  
 WAQPELRLPSMDRTFELFKSINKGRKMNIIDSMLRMEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTRLL  
 TQMLPPSVAEALKMGTPEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSH  
 DVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGHRHAAEIANMALDILSAVGTFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCV  
 AGVVGLTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNRSTVQILSALNEGFLTEVRGRTELKKGKAE  
 ETYWLVGRRGFNKP I PKPPDLQPGASNHGISLHEIPDRRQKLEKARPGQFSGK  
 (SEQ ID NO:4)

*Canis lupus familiaris* (собака; номер доступа в GenPept:  
 NP 001003207)

MSACALLAGGLPDPRLCAPARWARSPPGVPGAPPWPQPRLLRLLLLLPPSALS AVFTVGLVGPW  
 ACDPIFARARPDLAARLAARLNDAALLEGGRFEVTLLEPCRTPGSLGAVSSALGRVSGLVGPV  
 NPAACRPAELLAQEAGVALVPWSCPCGTRAGGTTAPAGTAAADALYALLRAFRWARVALITAPQDLW  
 VEAGRALSAALRARGLPVALVTTMEPSDLSGAREALRRVQDGRVRAVIMVMHVSLLGGEEQRCLL  
 QAAEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPEALAVLANSSQLRRAHDAVLI LTRHCPGGSVMDNLR  
 RAQEHQELPSDDLQVSPFFGTIYDAVLLLAGGVARARAAAGGGVWVSGATVAHHIPDAQVPGFCG  
 TLGGAQEPFFVLLDADAAGDRLFATYMLDPTRGSLLSAGTPVHFVPRGGTGGSDPSCWFEPGVI CN  
 GGVEPGLVFLGFLLVGMGLTGAFLAHYLRHRLHHIQMVSGPNKIILTDDVTFLLPHGGSTRKVV  
 QGSRSSLAARSTSDIRSVSQPLDNSNIGLFEQDWWLKKFPGDQHI AIRPATKTAFSKLELRHE  
 NVVLYLGLFLGSGGAGGSAAGEVLAVVSEHCARGSLHDLAQRDIKLDWMFKSSLLLDLIGKMR  
 YLHHRGVAGRLKSRNCVVDGRFVLKVTDHGHRLLMEAQRVLEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERR  
 GTLPGDVFSLGIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVVRVRSPPPLCRPSVSMQAPVECIQLMKQCW  
 AEHPDLRPSLGHIFDQFKSINKGRKTNII DSMLRMEQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTRLLT  
 QMLPPSVAEALKMGTPEPEYFEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAIIGSHD  
 VYKVTIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVA  
 GVVGLTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVRI LHALDEGFQTEVRGRTELKKGKAE  
 TYWLVGRRGFNKP I PKPPDLQPGASNHGISLQEIPLDRRWKLEKARPGQFSGK  
 (SEQ ID NO:5)

*Macaca mulatta* (макака резус; предсказанная  
 последовательность из XP 0011 11670)

MTACARRAGGLPDPRLCGPARWAPALPRLPRALPRLPLLLLLLQPPALS AVFTVGLVGPWACDP  
 IFSRARADLAARLAARLNRPDLAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALTRVSGLVGPVNPAA  
 CRPAELLAEEAGIALVPWGCPCGTAAGTTAPALTAAADALYALLRAFGWARVALVTAQDLWVEAG  
 HSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGRVTVAVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAE  
 ELGLTDGSLVFLPFDTVHYALSPGPEALAAALANSSQLRRAHDAVLTTRHCPSEGSVLDLRRRAQE  
 RRELPSDLNLQVSPFLFGTYDVFLLVRGVAEARAAGGRVWVSGAAVARHVWDAQVPGFCGDLGG  
 DEEPPFVLLDADAAGDRLFATYMLDPTRGSLLSAGTPMHFPRGGSAPGPDPCWFDPNNICGGGLE  
 PGLVFLGFLLVGMGLAGAFLAHYVRHQLHHIQMVSGPNKIILTVDITFLPHGGTSRKVAQGSR  
 SSLAARMSDVRSGPSQPTDSPNVGVYEGDRVWLKFKFGDQHI AIRPATKTAFSKLELRHENVL  
 YLGLFLAQAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDQLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIGKIRYLHHR  
 GVAHGRLLKSRNCIVDGRFVLKVTDHGHRLLLEAQRVLEPPRAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLA  
 GDVFSLAIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVQVRVRSPPPLCRPLVSMQAPVECIHLMKQCWAEQP

ELRPSMDHTFDLFDKFNINKGRKTNIIDSMLRMLQYSSNLEDLIRERTEELELEKQKTRDLLTQMLP  
 PSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKV  
 ETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAETANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVG  
 LTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVIGILRALDSGYQVELRGRTELKKGAEETFWL  
 VGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQEIIPERRRKLKARPGQFS (SEQ ID NO:6).

*Pongo abelii* (суматрийский орангутанг; предсказанная  
 последовательность из XP\_002827037)

MTACARRAGGLPDPGLCGPARWAPSLPRLPRALPRLPLLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLG  
 PWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRPDLGAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALAR  
 VSGLVGPNPAACRPAELLADNPGIALVPWGPCPWTQAEGTTAPCVTPAADALYALLRAFG  
 WARVALVTAPQDLWVEAGRSLSLALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRDGPVVT  
 AVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPEALAAALANSSQ  
 LRRHADAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRARERELPSDLNLQVSPFLGTIYDAVFLLRG  
 VAEAWAAGGRWVSGAAVARHIRDAQVPGFCGLDGGDEPPFVLLDADAAGDRLFATYML  
 DPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPSWDFPNNICGGLEPGLVFLGFLLVGMGLAG  
 AFLAHYVRRHLLHIQMVSGPNKIILTVNDITFLHPHGGRSRKVAQGSRSLSLAARSMGDIR  
 SGPSQPLDSPNVGVYEGDRVWLKFFPGDQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFL  
 ARGAECPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDLLSQREIKLDWMFKSSLLLDLIGKIRYLHHR  
 GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLEAQKVLPEPPRAEDQLWTAPELLRDPAL  
 RRGTLAGDVFSLAIIHQEVVCRSAPYAMLELTPPEEVQVRVRSPPPLCRPLVSMQAPVEC  
 IHLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFDKFNINKGRKTNIIDSMLRMLQYSSNLEDLIRERTE  
 ELELEKQKTRDLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIE  
 VVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAETANMSLDILSAV  
 GTFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGGLTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHV  
 NLSTVIGILRALDSGYQVELRGRTELKKGAEETFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHG  
 ISLQEIIPERRRKLKARPGQFS (SEQ ID NO:7)

*Callithrix jacchus* (белухая мармозетка; предсказанная  
 последовательность из XP\_002747985)

MTACARRAGGLPDPGLCGPARWAPALSRLPRALPRLPLLLLLLLLLQPPALSAQFTVGVLG  
 PWACDPIFSRARPDLAARLAAARLNRPDLGAGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALAR  
 VSGLVGPNPAACRPAELLAEAGIALVPWGPCPGTQAAGTTAPVVTAAADALYALLRAFG  
 WARVALVTAPQDLWVEAGLSLSTALRARGLPVSVTSMEPLDLSGAREALRKVRNGPVRT  
 AVIMVMHVSLLGGEEQRYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGREALAAALVNSSQ  
 LRRHADAVLTLTRHCSSEGSVLDLRLKAQRRELPSDLNLEQVSPFLGTIYDAVFLLRG  
 VADARAAGGRWVSGAAVARHVWDAQASGFCGLGRDEEPSFVLLDADAAGDQLFATYML  
 DPARGSLLSAGTPMHFPRGSPAGPDPSWDFPNNICDGGLEPGFIFLGFLLVGMGLAG  
 ALLAHYVRRHLLHIQMVSGPNKIILTVDDITFLHPHGGRSRKVAQGSRSLSLAHSTSDIR  
 SGPSQPSDSPNIGVYEGDRVWLKFFPGEQHIAIRPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFL  
 AQGAEGPAALWEGNLAVVSEHCTRGSLQDLLAQREIKLDWMFKSSLLLDLIGKIRYLHHR  
 GVAHGRLKSRNCIVDGRFVLKITDHGHGRLEAQKVLPEPPKAEDQLWTAPELLRDPAL  
 RRGTLAGDVFSLGIIHQEVVCRSAPYAMLELTPDEEVQVRVRSPPPLCRPFVSMQAPVEC  
 IHLMKQCWAEQPELRPSMDLTFDLFDKFNINKGRKTNIIDSMLRMLQYSSNLEDLIRERTE  
 ELELEKQKTRDLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIE  
 VVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAETANMSLDILSAV  
 GTFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGGLTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHV  
 NLSTVIGILRALDSGYQVELRGRTELKKGAEETFWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGASNHG  
 ISLQEIIPERRRKLKARPGQFS (SEQ ID NO:8)

*Ailuropoda melanoleuca* (гигантская панда; предсказанная последовательность из XP\_002921218)

MRACALLAGGLPYPRRLCAPTRWAPARPGVSRALPWPRPRLRLLLLLLPPSVLSAVFTV  
 GVLGPWACDPIFARARPDLDLXXXXXXXXXDALYVLLRAFRWARVALVTAPQDLWVEAGRAL  
 SAALRARGLPVALVTTMEPSDLSGAREALRRVQHGRVSAVIMVMHVSLLGGEEQRCLLQ  
 AAEEGLADGSLVFLPFDLTHYALSPGPEALANSSQLRRAHDAVLTTLTRHCPPGGSV  
 MDSLRRARQERQELPSDLNLEQVSPFLFGTIYDAVFLLAGGVARARAAAADSRVPGFCGALG  
 GAEEPPFVLLDADAAGDRFFATYVLDPTRGSLHSAGTPVHFPRGGGAPGDPSCWFEFDS  
 ICNGGVEPGLVFTGFLLVGMGLMGAFLAHYVRHRLHIIQMVSGPNKIILTLDDITFLHP  
 QGGSARKVQGSRSLSAARSTSDVRSVPSQPSDGNIGLYEGDWWLKKFPGSQHIAIRP  
 ATKTAFSKLRHLENVALYLGLFLGGGEGGSAAGGMLAVVSEHCTRGLSHDLAQRD  
 IKLDWMFKSLLLDLTKGMRYLHHRGVAHGRLKSRNCVVDGRFVVKVTDHGHGRLLAQK  
 VLAEPESAEDQLWTAPELLRDPALERRGTLAGDVFSLGIIIMQEVVCRSSPYAMLELSARE  
 VVQVRSPPLCRPSVSDQAPAEICQLMKQCWAEQPELRPSLDRTFDQFKSINKGRKTN  
 IIDSMRLMLEQYSSNLEGLIRERTEELELEKQKTDRLRAASLPSSVAEALMGTPEPEY  
 FEEVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLNDLYTLFDAIIGSHDVYKQVETIGDAYMVAS  
 GLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSFRMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMRP  
 YCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNMSTVIRILRALDEGFQTEVGRTELGKGAEDTYW  
 LVGXXXXXXXXPIPKPPDLQPGASNHGISLQEIPLDRRQKLEKARPGQFSGK (SEQ ID NO:9)

*Monodelphis domestica* (серый короткохвостый опоссум; предсказанная последовательность из XP\_001369029)

MLVPSINGLFHHPWCFFPLPLPLFFLFLLLLLPVPVLPATFTIGVLPWSCDPIFSRAR  
 PDLAARLAATRNMNHDQALEGGPWFEVILPEPCRTSGSLGALSPLARVSGLVGFVNPA  
 CHPAELLAQEAGVPLVPWGPCQGGKARTTAPALPLALDALYALLRAFWAKVALITAPQDL  
 WVEAGQALAGGLRSRGLPVAMVTSLETTDLESAKNALKRVDRGPKVKVIMVMHVSLLGG  
 EEQRLLEAAEELGLVEGTMVFLPFDLTHYALPPGPEALRPITNSRRLKHAHDAVLTTR  
 YCPKGSVSAASLRQAQEHRELPLDLKPKQVSPFLFGTIYDAIYLLAGAVAGAQQVAGGGGWS  
 GAAVARHIPTNLVSGFCGDLGGTKEPPFVLLDTDGMRDQLLPTYTLDPAQGVLLHAGNPI  
 HFPHGQGGPDPFCWFDPNVICSGGIEPRFILLVILIIIGGLVATLAYVRRQLLHA  
 QMVSGPNKMIITLEDITFFPRQGSRRKATEGSRSLIAHSASDMRSIPSQPPDNSNIGM  
 YEGDWWLKKFGEHYTEIRPATKMAFSKLRHLENVAQMGFLAGSMGAAAGGLGG  
 GILAVVSEYCSRGSQDLDLIRQDIKLDWMFKSLLLDLTKGLRYLHHRGVAHGRLKSRNC  
 VVDGRFVVKITDHAHGRLLLEAQRVSLPEPPQAEDRLWTAPELLRNEALERQGTQGDVFSV  
 GIIMQEVVCRCEPYAMLELTPEEIIQKVQSPPMCRPSVSDQAPMEICQLMKQCWAEQP  
 DLRPNMDDTDFDLFKNINKGRKTNIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTEELEKQKTDK  
 LQMLPPSVAEALKLGIPVEPEYFEEVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLNDLYTLF  
 DAIIGSHDVYKQVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMSLDILSSVGSFRMRHMPEVP  
 VRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMRPYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNLSTVKILQGLN  
 EGFQIEIRGRTELGKGVEDTYWLVGRKGFDPKPIPIPPDLQPGASNHGISLQEIPEPDRR  
 KLEKARPGQPLGK (SEQ ID NO:10)

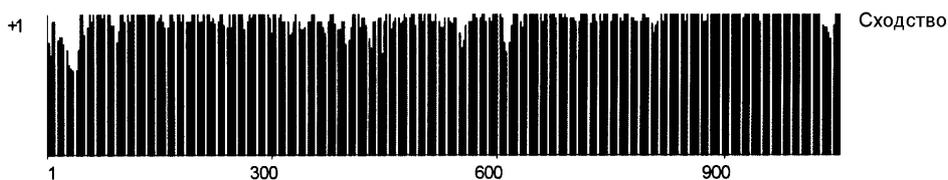
*Equus caballus* (лошадь; предсказанная последовательность из XP\_001918412)

MVMHVSLLGGEEQRCLLEAAEELGLADGSLVFLPFDLTHYALSPGPEALAVLANSSQLRR  
 AHDVLTTLTRHCPLGGVLDLRRARQEHQELPSDLNLQVSPFLFGTIYDAVYLLAGGVAR  
 ARAAAGGSVWSGAAVAHVDRDAQVPGFCGALGGAEQFVLLDADAAGDRLFATYMLDPT  
 RGLSWSAGTPVHFPRGGRGPGDPWCWFDPDDICNGGVEPRLVFIGFLAVGMGLAGVFL  
 AHYVRHRLHIIQMASGPNKIILTLDDITFLHPQGGSSRQIIGSRSSLAARSVSDIRSV  
 SQPMDSSNIGLYEGDWWLKKFPGDQHTAIRPATKTAFSKLRHLENVALYLGLFLAGG  
 SSGAAAPREGMLAVVSEHCARGSLHDLAQRDIKLDWMFKSLLLDLTKGMRYLHHRGVA  
 HGRLKSRNCVVDGRFVVKVTDHGHGRLLLEAQKVLPEPPSAEDQLWTAPELLRDPALERQ  
 TLAGDVFSLGIIIMQEVVCRSTPYAMLELTPEEVVQRLQSPPLCRPSVSMQAPMEICQL  
 MKQCWAEQPDRLPSMDRTFDLFSINKGRKTNIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTEELE  
 LEKQKTDRLTLQMLPPSVAEALMGTPEPEYFEEVTLVYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVD  
 LLNDLYTLFDAIIGSHDVYKQVETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEIANMALDILSAVGSF  
 RMRHMPEVPVIRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMRPYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNM  
 TVRIRILRALDEGFQVEVGRTELGKGVEDTYWLVGRRGFNKPIPKPPDLQPGASNHGISL  
 QEIPERRQKLEKARPGQFSGK (SEQ ID NO:11)

Пример 9. Анализ последовательностей известных полипептидов GC1 млекопитающих.

Все данные по выравниванию GC1 получены с помощью аминокислотной последовательности для следующих видов: *Bos taurus* (жвачное животное; 1110 остатков), *Canis lupus familiaris* (собака; 1109 остатков), *Mus musculus* (мышь; 1108 остатков) и *Homo sapiens* (человек; 1103 остатков). Положения консенсуса и переменные области основаны на номерах остатков, соответствующих *Bos Taurus*, поскольку это самый длинный белок GC1, состоящий из 1110 остатков и не имеющий гэпов при выравнивании.

Сходство картин выравнивания белков GC1 из *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Mus musculus* и *Homo sapiens*.



Консенсусные области GC1:

аминокислотные положения: 44-49, 55-90, 98-155, 164-321, 464-549, 561-604, 620-761, 813-1026, 1045-1054 и 1060-1110.

Вариабельные области:

аминокислотные положения: 4-43, 50-54, 91-97, 156-163, 322-463, 550-560, 605-619, 762-812, 1027-1044 и 1055-1059.

Другие характерные области GC1 при консенсусном выравнивании включают в себя следующие области:

(1) гомологичный киназе домен: аминокислотные положения от 531 до 541 консенсусной последовательности (известной тем, что она необходима для активности в фоторецепторах - см., например, Vereta et al., 2010);

(2) фосфорилированные сериновые остатки внутри гомологичного киназе домена мышинового белка GC1 (консенсус/положения в белке жвачного животного приведены в скобках): 530 (532), 532 (534), 533 (535) и 538 (540).

Пример 10. Нуклеотидная последовательность промотора smCBA.

Последовательность нуклеиновой кислоты иллюстративного человеческого промотора GRK1 (hGRK1), который был использован в описанных здесь исследованиях, представлен ниже:

```
GGGCCCCAGAAGCSTGGTGGTTGTTTGTCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCSTTGGAGGAAGG
GGCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCGAAGCAGCTCAGGGGATTTCTTTTTCTAGCACSTTCTTG
CСACTCСТАAGCGTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTGTCAGCCCGGTCTCCC
AGGGGCTTCCSAGTGGTCCCAGGAACССТCGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGG
ACGGGCCACAGGCCAAGGGC (SEQ ID NO:12)
```

Последовательность нуклеиновой кислоты иллюстративного промотора smCBA, который был использован в описанных здесь исследованиях, представлен ниже:

```
AATTCGGTACCSTAGTTATTAATAAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACSTTATGGGACTT
TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCAAGTT
CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATT
ATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGCGGGCGGGGCGA
GGGGCGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCGCCAAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTT
TCSTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGCGGGCGGGAGT
CGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCGTGCCCGCTCCGCGCGCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCT
GACTGACCGCTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGACGGCCSTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
GCTTGGTTTAAATGACGGCTTGTCTTTCTTTCTGTGGCTGCGTAAAGCCTTGAGGGCTCCGGGAGC
TAGAGCCTCTGСТААССАТGTTСАТGСCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT
TATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAG (SEQ ID NO:13)
```

**Ссылки**

Следующие ссылки, которые в определенной степени обеспечивают иллюстративные процедурные или иные подробности, дополнительно к тем, которые здесь описаны, специально включены в настоящее описание в качестве ссылок.

- Патент Соединенных Штатов Америки 4237224, опубликованный 2 декабря 1980.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4554101, опубликованный 19 ноября 1985.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4683195, опубликованный 28 июля 1987.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4683202, опубликованный 28 июля 1987.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4800159, опубликованный 24 января 1989.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4883750, опубликованный 28 ноября 1989.
- Патент Соединенных Штатов Америки 4987071, опубликованный 22 января 1991.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5145684, опубликованный 8 сентября 1992.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5334711, опубликованный 2 августа 1994.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5354855, опубликованный 11 октября 1994.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5399363, опубликованный 21 марта 1995.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5466468, опубликованный 14 ноября 1995.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5543158, опубликованный 6 апреля 1996.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5552157, опубликованный 3 сентября 1996.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5565213, опубликованный 15 октября 1996.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5567434, опубликованный 22 октября 1996.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5602306, опубликованный 11 февраля 1997.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5631359, опубликованный 20 мая 1997.
- Патент Соединенных Штатов Америки 5639940, опубликованный 17 июня 1997.

Патент Соединенных Штатов Америки 5641515, опубликованный 24 июня 1997.

Патент Соединенных Штатов Америки 5656016, опубликованный 12 августа 1997.

Патент Соединенных Штатов Америки 5697899, опубликованный 16 декабря 1997.

Патент Соединенных Штатов Америки 5720936, опубликованный 24 февраля 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5738868, опубликованный 14 апреля 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5741516, опубликованный 21 апреля 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5770219, опубликованный 23 июня 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5779708, опубликованный 14 июля 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5783208, опубликованный 21 июля 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5789655, опубликованный 4 августа 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5795587, опубликованный 18 августа 1998.

Патент Соединенных Штатов Америки 5797898, опубликованный 25 августа 1998.

Международная патентная заявка No. PCT US87/00880.

Международная патентная заявка No. PCT/US88/10315.

Международная патентная заявка No. PCT/US89/01025.

Публикация международной патентной заявки No. WO 89/06700.

Публикация международной патентной заявки No. WO 91/03162.

Публикация международной патентной заявки No. WO 92/07065.

Публикация международной патентной заявки No. WO 93/15187.

Публикация международной патентной заявки No. WO 93/23569.

Публикация международной патентной заявки No. WO 94/02595.

Публикация международной патентной заявки No. WO 94/13688.

Публикация европейской патентной заявки No. EP 0329822.

Публикация европейской патентной заявки No. EP 0360257.

Публикация европейской патентной заявки No. EP 92110298,4.

Публикация европейской патентной заявки No. 320308.

Заявка Великобритании No. 2202328.

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J., "Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness," *Nat. Genet.*, 28(1): 92-5, 2001.

Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, Chang B, Мин. SH, et al., "Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia," *Nat. Med.*, 13: 685-687, 2007.

Alstrom, C.H. "Heredo-retinopathia congenitalis monohybrida recessiva autosomalis: a genetical-statistical study in clinical collaboration with Olof Olson," *Hereditas*, 43: 1-178, 1957.

Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN Jr, "G proteins and phototransduction," *Annu. Rev. Physiol.*, 64: 153-187, 2002.

Azadi S et al., "RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells," *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 21 158-63, 2010.

Baehr W, aran S, Maeda T, Luo DG, Li S, Bronson JD, Watt CB, Yau KW, Frederick JM, Palczewski., "The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors," *J. Biol. Chem.*, 282(12): 8837-47, 2007.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K et al., "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, 358: 2231-2239, 2008.

Beltran W, Boye SL, Boye SE, Chiodo V, Lewin AS et al., "rAAV2/5 gene-targeting to rods: dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters," *Gene Ther.*, 17: 1162-1 174, 2010.

Bereta G, Wang B, Kiser PD, Baehr W, Jang GF, Palczewski K., "A functional kinase homology domain is essential for the activity of photoreceptor guanylate cyclase 1," *J. Biol. Chem.*,

285(3): 1899-908, 2010.

Bhowmick R, Li M, Sun J, Baker SA, Insinna C, Besharse JC, "Photoreceptor IFT complexes containing chaperones, guanylyl cyclase 1 and rhodopsin," *Traffic*, 10: 648-63, 2009.

Boye SE, Boye SL, Pang J, Ryals R, Everhart D, Umino Y et al., "Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse," *PLoS One*, 5:e11306, 2010.

Burns ME and Arshavsky VY, "Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction," *Neuron*, 48: 387-401, 2005.

Camuzat, A.; Dollfus, H.; Rozet, J.-M.; Gerber, S.; Bonneau, D.; Bonnemaïson, M.; Briard, M.-L.; Dufier, J.-L.; Ghazi, I.; Leowski, C; Weissenbach, J.; Frezal, J.; Munnich, A.; Kaplan, J., "A gene for Leber's congenital amaurosis maps to chromosome 17p," *Hum. Molec. Genet*, 4: 1447-1452, 1995.

Camuzat, A.; Rozet, J.-M.; Dollfus, H.; Gerber, S.; Perrault, I.; Weissenbach, J.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Evidence of genetic heterogeneity of Leber's congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13," *Hum. Genet.*, 97: 798-801, 1996.

Chung DC and Traboulsi EI, "Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions," *J. AAPOS.*, 13:587-92, 2009.

Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S et al., "Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15112-7, 2008.

Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL et al., "Vision one year after gene therapy for Leber congenital amaurosis," *N Engl. J. Med.*, 361: 725-727, 2009.

Coleman JE and Semple-Rowland SL, "GC1 deletion prevents light-dependent arrestin translocation in mouse cone photoreceptor cells," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 12-6, 2005.

Coleman JE, Zhang Y, Brown GA, Semple-Rowland SL, "Cone

cell survival and downregulation of GCAP1 protein in the retinas of GCL knockout mice," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45: 3397-403, 2004.

Cremers, F. P. M.; van den Hurk, J. A. J. M.; den Hollander, A. I., "Molecular genetics of Leber congenital amaurosis," *Hum. Molec. Genet.* 11: 1169-1176, 2002.

den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers RP "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms," *Prog Ret Eye Res* 27:301-419, 2008.

Dizhoor AM, Lowe DG, Olshevskaya EV, Laura RP and Hurley JB, "The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator," *Neuron*, 12: 1345-52, 1994.

Douglas RM, Alam NM, Silver BD, McGill TJ, Tschetter WW et al., "Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system," *Vis. Neuro.*, 22: 677-684, 2005.

Downes SM, Payne AM, Kelsell RE, Fitzke FW, Holder GE, Hunt DM et al., "Autosomal dominant cone-rod dystrophy with mutations in the guanylate cyclase 2D gene encoding retinal guanylate cyclase-1.

*Arch. Ophthalmol*, 119: 1667-1673, 2001.

Ehara, H.; Nakano, C; Ohno, K.; Goto, Y.-L; Takeshita, K., "New autosomal-recessive syndrome of Leber congenital amaurosis, short stature, growth hormone insufficiency, mental retardation, hepatic dysfunction, and metabolic acidosis," *Am. J. Med. Genet.* 71: 258-266, 1997.

Ek, J.; Kase, B. F.; Reith, A.; Bjorkhem, I.; Pedersen, J. I., "Peroxisomal dysfunction in a boy with neurologic symptoms and amaurosis (Leber disease): clinical and biochemical findings similar to those observed in Zellweger syndrome," *J. Pediat.* 108: 19-24, 1986.

Francois, J., "Leber's congenital tapetoretinal degeneration," *Int. Ophthal. Clin.*, 8: 929-947, 1968.

Gillespie, F. D., "Congenital amaurosis of Leber," *Am. J. Ophthal.* 61: 874-880, 1966.

Glushakova LG et al., "Does recombinant adeno-associated virus-vectored proximal region of mouse rhodopsin promoter support only rod-type specific expression *in vivo*? Mol. Vis. 12: 298-309, 2006.

Gorczyca WA et al., "Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods," Proc Natl Acad Sci USA, 91: 4014-8, 1994.

Haire SE, Pang J, Boye SL, Sokal I, Craft CM et al., "Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC 1," Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 47(9): 3745-53, 2006.

Hanein, S.; Perrault, I.; Gerber, S.; Tanguy, G.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Calvas, P.; Dollfus, H.; Hamel, C; Lopponen, T.; Munier, F.; Santos, L.; Shalev, S.; Zafeiriou, D.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Rozet, J.-M.; Kaplan, J., "Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis," Hum. Mutat. 23: 306-317, 2004.

Hanein, S.; Perrault, I.; Olsen, P.; Lopponen, T.; Hietala, M.; Gerber, S.; Jeanpierre, M.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Hakiki, S.; Munnich, A.; Rozet, J.-M.; Kaplan, J., "Evidence of a founder effect for the RETGC1 (GUCY2D) 2943DelG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin," (Abstract)

Hum. Mutat., 20: 322-323, 2002.

Hauswirth W, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L et al., "Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial," Hum. Gene Ther., 19: 979-990, 2008.

Hayasaka, S.; Hara, S.; Mizuno, K.; Narisawa, K.; Tada, K., "Leber's congenital amaurosis associated with hyperthreoninemia," Am. J. Ophthal, 101: 475-479, 1986.

Huang Y, Cideciyan AV, Papastergiou GI, Banin E, Semple-Rowland SL et al., "Relation of optical coherence tomography to

microanatomy in normal and rd chickens," *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.*, 39: 2405-16, 1998.

Jacobson SG et al., "Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis," *Hum Gene Ther.* 17: 845-58. 2006.

Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB et al., "Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection," *Mol. Ther.*, 13: 1074-84, 2006.

Karan S, Frederick JM and Baehr W, "Novel functions of photoreceptor guanylate cyclases revealed by targeted deletion," *Mol. Cell. Biochem.*, 334: 141-55, 2010.

Khani SC, Pawlyk BS, Bulgakov OV, Kasperek E, Young JE, "AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48: 3954-61, 2007.

Khanna, H.; Davis, E. E.; Murga-Zamalloa, C. A.; Estrada-Cuzcano, A.; Lopez, I.; den Hollander, A.I.; Zonneveld, M. N.; Othman, M.I.; Waseem, N.; Chakarova, C. F.; Maubaret, C; Diaz-Font, A. et al., "A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies," *Nature Genet.*, 41: 739-745, 2009.

Kolstad KD et al., "Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration," *Hum. Gene Ther.*, 21: 571-8, 2010.

Komaromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, Garcia MM, Chiodo VA, Kaya A et al "Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia." *Hum Mol Genet.* April 21 [Epub, в печати], 2010.

Lamb TD, Pugh EN Jr, "Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture,"

*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 5138-5152, 2006.

Lambert, S. R.; Sherman, S.; Taylor, D.; Kriss, A.; Coffey, R.; Pembrey, M., "Concordance and recessive inheritance of Leber congenital amaurosis," *Am. J. Med. Genet.*, 46: 275-277, 1993.

Leber, T., "Ueber anomale formen der retinitis pigmentosa," Albrecht von Graefes Arch. Ophthal, 17: 314-340, 1871.

Leber, T., "Ueber retinitis pigmentosa und angeborene amaurose," Albrecht von Graefes Arch. Ophthal. 15: 1-25, 1869.

Li T, Pawlyk BS, Bulgakov OV, Liu X, Xu X, Adamian M, Sun X, Khani SC, Berson EL, Sandberg M, "Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis," Hum. Gene Ther., 21(8): 993-1004, 2010.

Li W et al., "Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye," Mol Vis., 14: 267-75, 2009.

Liu X, Seno K, Nishizawa Y, Hayashi F, Yamazaki A et al., "Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas," Exp. Eye Res., 59: 761-8, 1994.

Liu, L, Barone I, Dai X, Lei B, Boye SL, Chiodo V, Chang B, Hauswirth WW, Strettoi E, Pang JJ, "Gene therapy preserves inner retinal neurons and their connectivity in rd10 mice, a model of recessive retinitis pigmentosa with [Rho][upsilon][Epsilon][beta] mutations," Abstr. ARVO Annu. Meet, #3112, 2010.

Livak KJ and Schmittgen "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25: 402-8, 2001.

Lotery AJ et al. "Adeno-associated virus type 5 transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina," Hum Gene Ther., 14: 1663-71, 2003.

Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M et al., "Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5535-9, 1995.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh Jr EN, Mingozzi F, Bennicelli J et al., "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis," N. Engl. J. Med, 358:/2240-

2248, 2008.

Mah et al., "Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice,"

Hum. Gene Ther., 14(2): 143-152, 2003.

Mancuso K et al "Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates," Nature 461: 784-7, 2009.

McCarty et al., "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transfection *in vivo*," Gene Ther., 10(26): 2112-2118, 2003.

Mendez A, Burns ME, Sokal I, Dizhoor AM, Baehr W, Palczewski K, Baylor DA, Chen J., "Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors," Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 98(17): 9948-53, 2001.

Milam, A. H.; Barakat, M. R.; Gupta, N.; Rose, L.; Aleman, T. S.; Pianta, M. J.; Cideciyan, A. V.; Sheffield, V. C; Stone, E. M.; Jacobson, S.G., "Clinicopathologic effects of mutant GUCY2D in Leber congenital amaurosis," Ophthalmology, 110: 549-558, 2003.

Moore, A. T.; Taylor, D. S. I. "A syndrome of congenital retinal dystrophy and saccade palsy--a subset of Leber's amaurosis, Brit. J. Ophthal, 68: 421-431, 1984.

Nakamura, M.; Ito, S.; Miyake, Y. "Novel de novo mutation in CRX gene in a Japanese patient with Leber congenital amaurosis," Am. J. Ophthal, 134: 465-467, 2002.

Natkunarajah M et al., "Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8," Gene Ther., 15: 463-7, 2008.

Nickel, B.; Hoyt, C. S. "Leber's congenital amaurosis. Is mental retardation a frequent associated defect?" Arch. Ophthal, 100: 1089-1092, 1982.

Otto-Brac A, Buczylo J, Surgucheva I, Subbaraya I, Rudnicka-Nawrot M et al., "Functional reconstitution of photoreceptor guanylate cyclase with native and mutant forms of guanylate cyclase-activating protein 1," Biochemistry, 36:

4295-302, 1997.

Palczewski K et al., "Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein," *Neuron* 13: 395-404, 1994.

Pang J, Boye SE, Lei B, Boye SL, Everhart D, Ryals R, Umino Y, Rohrer B, Alexander J, Li J, Dai X, Li Q, Chang B, Barlow R, Hauswirth WW, "Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency," *Gene Ther.*, 17(7): 815-826, 2010.

Pang JJ, Boye SL, Kumar A, Dinculescu A, Deng W, Li J, Li Q, Rani A, Foster TC, Chang B, Hawes NL, Boatright JH, Hauswirth WW, "AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd 10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49(10): 4278-83, 2008.

Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J, Rani A, Foster TC, Chiodo VA, Doyle T, Li H, Malhotra R, Teusner JT, McDowell JH, MHN. SH, Li Q, Kaushal S, Hauswirth WW, "Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis," *Mol. Ther.*, 13(3): 565-72. 2006.

Pang JJ, Dai X, Boye SE, Barone I, Boye SL, Mao S et al., "Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa," *Mol. Ther.* 19: 234-42, 2011.

Pang JJ, Dai X, Everhart D, 3, Lei B, Boye SL, Dinculescu A, Umino Y, Chang B, Barlow R, Hauswirth WW., "Long-term rescue following gene therapy with capsid mutant AAV8 in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa," *ARVO Abstract 2527, Annu. Meet.*, 2010.

Pasadhika S, Fishman GA, Stone EM, Lindeman M, Zelkha R et al., "Differential macular morphology in patients with RPE65, CEP290, GUCY2D and AIPL1 related Leber congenital amaurosis," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51(5): 2608-2614, 2010.

Pawlyk BS et al., "Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of leber congenital amaurosis," Hum Gene Ther., Apr 12 [Epub, в печати], 2010.

Payne AM, Morris AG, Downes SM, Johnson S, Bird AC, Moore AT et al., "Clustering and frequency of mutations in the retinal guanylate cyclase (GUCY2D) gene patients with dominant cone-rod dystrophies," J Med Genet. 38: 611-614, 2001.

Perrault et al., "Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis," Nat. Genet., 14(4): 461-4, 1996.

Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Ducroq D et al., "Spectrum of retGC 1 mutations in Leber's congenital amaurosis," Eur. J. Hum. Genet., 8: 578-82, 2000.

Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Leowski C et al., "Leber congenital amaurosis," Mol Genet. Metab., 68: 200-8, 1999.

Perrault, I.; Rozet, J. M.; Calvas, P.; Gerber, S.; Camuzat, A.; Dollfus, H.; Chatelin, S.; Souied, E.; Ghazi, I.; Leowski, C; Bonnemaïson, M.; Le Paslier, D.; Frezal, J.; Dufier, J.-L.; Pittler, S.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis," Nature Genet, 14: 461-464, 1996.

Perrault, I.; Rozet, J.-M.; Gerber, S.; Ghazi, I.; Leowski, C; Ducroq, D.; Souied, E.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Kaplan, J., "Leber congenital amaurosis," Molec. Genet. Metab., 68: 200-208, 1999.

Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Мин. SH, Chiodo V, Pang JJ, et al. "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," Mol. Ther. 17: 463-71, 2009.

Poirier, A et al. "Toxicology and biodistribution studies of a recombinant adeno-associated virus 2-a-1 antitrypsin vector," Preclinica 2: 43-51, 2004.

Polans A, Baehr W, Palczewski K "Turned on by Ca<sup>2+</sup>! The physiology and pathology of Ca<sup>2+</sup> binding proteins in the

retina," Trends Neurosci 19: 547-554, 2006.

Provost N et al., "Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain," Mol Ther., 11: 275-83, 2005.

Pugh EN Jr, Duda T, Sharma RK, Sitaramayya A "Photoreceptor guanylate cyclases: a review," Biosci Rep., 17: 429-473, 1997.

Rahn, E. K.; Falls, H. F.; Knaggs, J. G.; Proux, D. J., "Leber's congenital amaurosis with an Ehlers-Danlos-like syndrome: study of an American family," Arch. Ophthal, 79: 135-141, 1968.

Riess, O.; Weber, B.; Noeremolle, A.; Shaikh, R.A.; Hayden, M.R.; Musarella, M.A., "Linkage studies and mutation analysis of the PDEB gene in 23 families with Leber congenital amaurosis," Hum. Mutat., 1:478-485, 1992.

Russell-Eggitt, I. M; Taylor, D. S. I.; Clayton, P. T.; Garner, A.; Kriss, A.; Taylor, J. F. N. "Leber's congenital amaurosis-a new syndrome with a cardiomyopathy," Brit. J. Ophthal, 73: 250-254, 1989.

Schappert-Kimmijser, J.; Henkes, H. E.; Van den Bosch, J. "Amaurosis congenita (Leber)," Arch. Ophthal, 61: 21 1-218, 1959.

Schroeder, R.; Mets, M. B.; Maumenee, I. H. "Leber's congenital amaurosis: retrospective review of 43 cases and a new fundus finding in two cases," Arch. Ophthal., 105: 356-359, 1987.

Schuil, J.; Meire, F. M; Delleman, J. W. "Mental retardation in amaurosis congenita of Leber," Neuropediatrics, 29:294-297, 1998.

Semple-Rowland SL, Lee NR, Van Hooser JP, Palczewski K, Baehr W, "A null mutation in the photoreceptor гуанилатциклаз gene causes the retinal degeneration chicken phenotype," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 1271-6, 1998.

Simonelli F, Ziviello C, Testa F, Rossi S, Fazzi E et al., "Clinical and molecular genetics of Leber's congenital

amaurosis: a multicenter study of Italian patients," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48: 4284-90, 2007.

Schocki, M. M.; Bowne, S. J.; Sullivan, L. S.; Blackshaw, S.; Cepko, C. L.; Payne, A. M.; Bhattacharya, S. S.; Khaliq, S.; Mehdi, S. Q.; Birch, D. G.; Harrison, W. R.; Elder, F. F. B.; Heckenlively, J. R.; Daiger, SP, "Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis," *Nature Genet.* 24: 79-83, 2000.

Song S et al. "Intramuscular administration of рекомбинантн adeno-associated virus 2  $\alpha$ -1 antitrypsin (rAAV-SERPINAL) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects," *Mol. Ther.*, 6: 329-335, 2002.

Sorsby, A.; Williams, C. E., "Retinal aplasia as a clinical entity," *Brit. Med. J.* 1: 293-297, 1960.

Stephen R et al., "Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal кальци sensor, guanylate cyclase-activating protein 1," *Structure* 15: 1392-402, 2007.

Stieger K et al., "Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain," *Mol Ther.* 16: 916-23, 2008.

Sun X, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bulgakov OV et al., "Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by A1PL1 mutations," *Gene Ther.*, 17: 117-31, 2010.

Surace EM and Auricchio A. "Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer," *Vis. Res.*, 48: 353-359, 2007.

Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X et al., "Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in A1PL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors," *Hum. Mol. Genet.*, 18: 2099-114, 2009.

Timmers AM, Zhang H, Squitieri A, Gonzalez-Pola C, "Subretinal injections in rodent eyes: effects on electrophysiology and histology of rat retina," *Mol. Vis.*, 7:

131-7, 2001.

Traint and Whitehead, "Simultaneous Extraction of High-Quality PHK and ДHK from Small Tissue Samples," *Heredity*, 100: 246-250, 2009.

Ulshafer RJ, Allen C, Dawson WW and Wolf ED, "Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken. I. Histology and ERG," *Exp. Eye Res.*, 39: 125-35, 1984.

Umino Y, Solessio E, Barlow RB, "Speed, spatial, and temporal tuning of rod and cone vision in mouse," *J.Neurosci.*, 28: 189-198, 2008.

Waardenburg, P. J.; Schappert-Kimmijser, J., "On various recessive biotypes of Leber's congenital amaurosis," *Acta Ophthalm.*, 41:317-320, 1963.

Wagner, R. S.; Caputo, A. R.; Nelson, L. B.; Zanoni, D., "High hyperopia in Leber's congenital amaurosis," *Arch. Ophthalm.*, 103: 1507-1509, 1985.

Weiss ER, et al., "Species-specific differences in expression of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) 7 and GRK1 in mammalian cone photoreceptor cells: implications for cone cell phototransduction," *J. Neurosci.*, 21: 9175-84, 2001.

Wensel TG "Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments," *Vis Res.* 48: 2052-2061, 2008.

Wilkie SE, Newbold FJ, Deery E, Walker CE, Stinton I, Ramamurthy V et al., "Functional characterization of missense mutations at codon 838 in retinal guanylate cyclase correlates with disease severity in patients with autosomal dominant cone-rod dystrophy," *Hum Mol Genet.*, 9: 3065-3073, 2000.

Williams GA and Jacobs GH "Cone-based vision in the aging mouse," *Vision Res* 47: 2037-46, 2007.

Williams ML, Coleman JE, Haire SE, Aleman TS, Cideciyan AV, "Lentiviral expression of retinal guanylate cyclase-1 (RetGC 1) restores vision in an avian model of childhood blindness," *PLoS. Med.*, 3:e201, 2006.

Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC et al., "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size," *J.*

*Virology*, 76: 7651-60, 2002.

Yang RB and Garbers DL, "Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers," *J. Biol. Chem.*, 272: 13738-42, 1997.

Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fulle HJ, "Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 602-6, 1995.

Yang RB and Garbers DL "Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers," *J. Biol. Chem.*, 272: 13738-13742, 1997.

Yang RB, Robinson SW, Xiong WH, Yau KW, Birch DG et al., "Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior," *J. Neurosci.*, 19: 5889-97, 1999.

Yano, S.; Oda, K.; Watanabe, Y.; Watanabe, S.; Matsuishi, T.; Kojima, K.; Abe, T.; Kato, H. "Two sib cases of Leber congenital amaurosis with cerebellar vermis hypoplasia and multiple systemic abnormalities," *Am. J. Med. Genet.*, 78: 429-432, 1998.

Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, Dalkara D, Kolstad KD, Masella BD et al., "Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Feb 10, 2011.

Zernant, J.; Kulm, M.; Dharmaraj, S.; den Hollander, A. I.; Perrault, I.; Preising, M. N.; Lorenz, B.; Kaplan, J.;

Cremers, F. P. M.; Maumenee, I.; Koeneke, R. K; Allikmets, R., "Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46: 3052-3059, 2005.

Zhang H, Huang W, Zhang H, Zhu X, Craft CM et al., "Light-dependent redistribution of visual arrestins and transducin subunits in mice with defective phototransduction," *Mol. Vis.*, 9: 231-7, 2003.

Zhong L, et al., "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 7827-32, 2008.

Zhu X, Li A, Brown B, Weiss ER, Osawa S, Craft CM, "Mouse cone arrestin expression pattern: light induced translocation in cone photoreceptors," *Mol. Vis.*, 8: 462-71, 2002.

Zolotukhin S et al., "Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods*, 28(2): 158-67, 2002.

Все из описанных, а также заявленных здесь композиций и способов могут в свете настоящего описания быть осуществлены без излишнего экспериментирования. Несмотря на то, что композиции и способы согласно настоящему изобретению описаны здесь в терминах предпочтительных воплощений, рядовым специалистам в данной области следует иметь в виду, что в описанные здесь композиции и способы, а также в стадии или в последовательность выполнения стадий описанного здесь способа могут быть внесены определенные изменения, не выходящие за рамки концепции, замысла, истинного смысла и объема, охватываемого настоящим изобретением. Более конкретно, совершенно очевидно, что определенные средства, которые являются и химически, и физиологически родственными, могут заменить описанные здесь средства с получением таких же или сходных результатов. Все такого рода сходные замены

и модификации, очевидные с точки зрения специалистов в данной области, считаются входящими в рамки концепции, замысла и объема, охватываемого настоящим изобретением, определяемым прилагаемой формулой изобретения.

### Список последовательностей

<110> University of Florida Research Foundation, Inc.  
Boye, Shannon E.  
Hauswirth, William W.  
Boye, Sanford L.

<120> РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУСНЫЙ ВЕКТОР (RAAV), КОДИРУЮЩИЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНУЮ, СПЕЦИФИЧНУЮ В ОТНОШЕНИИ СЕТЧАТКИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗУ ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБНЫЙ ПРЕДОХРАНИТЬ ИЛИ ВОССТАНАВЛИВАТЬ ОПОСРЕДОВАННУЮ КОЛВОЧКАМИ ФУНКЦИЮ ГЛАЗА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО

<130> 36689.309

<150> US 61/327,521  
<151> 2010-04-23

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 1103  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gly Gly Leu Pro Asp Pro Gly Leu  
1 5 10 15

Cys Gly Pro Ala Trp Trp Ala Pro Ser Leu Pro Arg Leu Pro Arg Ala  
20 25 30

Leu Pro Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro  
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Val Phe Thr Val Gly Val Leu Gly Pro Trp Ala Cys  
50 55 60

Asp Pro Ile Phe Ser Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala Ala Arg Leu Ala  
65 70 75 80

Ala Ala Arg Leu Asn Arg Asp Pro Gly Leu Ala Gly Gly Pro Arg Phe  
85 90 95

Glu Val Ala Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr Pro Gly Ser Leu Gly  
100 105 110

Ala Val Ser Ser Ala Leu Ala Arg Val Ser Gly Leu Val Gly Pro Val  
115 120 125

Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala Glu Glu Ala Gly  
130 135 140

035893

Ile Ala Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Trp Thr Gln Ala Glu Gly Thr  
145 150 155 160

Thr Ala Pro Ala Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu Tyr Ala Leu Leu  
165 170 175

Arg Ala Phe Gly Trp Ala Arg Val Ala Leu Val Thr Ala Pro Gln Asp  
180 185 190

Leu Trp Val Glu Ala Gly Arg Ser Leu Ser Thr Ala Leu Arg Ala Arg  
195 200 205

Gly Leu Pro Val Ala Ser Val Thr Ser Met Glu Pro Leu Asp Leu Ser  
210 215 220

Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Lys Val Arg Asp Gly Pro Arg Val Thr  
225 230 235 240

Ala Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln  
245 250 255

Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Thr Asp Gly Ser  
260 265 270

Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Ile His Tyr Ala Leu Ser Pro Gly  
275 280 285

Pro Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asn Ser Ser Gln Leu Arg Arg Ala  
290 295 300

His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Pro Ser Glu Gly Ser  
305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu Arg Arg Glu Leu Pro Ser  
325 330 335

Asp Leu Asn Leu Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp  
340 345 350

Ala Val Phe Leu Leu Ala Arg Gly Val Ala Glu Ala Arg Ala Ala Ala  
355 360 365

Gly Gly Arg Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg His Ile Arg Asp  
370 375 380

Ala Gln Val Pro Gly Phe Cys Gly Asp Leu Gly Gly Asp Glu Glu Pro  
385 390 395 400

## 035893

Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp Arg Leu Phe Ala  
 405 410 415

Thr Tyr Met Leu Asp Pro Ala Arg Gly Ser Phe Leu Ser Ala Gly Thr  
 420 425 430

Arg Met His Phe Pro Arg Gly Gly Ser Ala Pro Gly Pro Asp Pro Ser  
 435 440 445

Cys Trp Phe Asp Pro Asn Asn Ile Cys Gly Gly Gly Leu Glu Pro Gly  
 450 455 460

Leu Val Phe Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met Gly Leu Ala Gly  
 465 470 475 480

Ala Phe Leu Ala His Tyr Val Arg His Arg Leu Leu His Met Gln Met  
 485 490 495

Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Val Asp Asp Ile Thr Phe  
 500 505 510

Leu His Pro His Gly Gly Thr Ser Arg Lys Val Ala Gln Gly Ser Arg  
 515 520 525

Ser Ser Leu Gly Ala Arg Ser Met Ser Asp Ile Arg Ser Gly Pro Ser  
 530 535 540

Gln His Leu Asp Ser Pro Asn Ile Gly Val Tyr Glu Gly Asp Arg Val  
 545 550 555 560

Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Asp Gln His Ile Ala Ile Arg Pro Ala  
 565 570 575

Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Gln Glu Leu Arg His Glu Asn Val  
 580 585 590

Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Arg Gly Ala Glu Gly Pro Ala  
 595 600 605

Ala Leu Trp Glu Gly Asn Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Thr Arg  
 610 615 620

Gly Ser Leu Gln Asp Leu Leu Ala Gln Arg Glu Ile Lys Leu Asp Trp  
 625 630 635 640

Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Ile Arg Tyr  
 645 650 655

035893

Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn Cys  
660 665 670

Ile Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp His Gly His Gly  
675 680 685

Arg Leu Leu Glu Ala Gln Lys Val Leu Pro Glu Pro Pro Arg Ala Glu  
690 695 700

Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Glu  
705 710 715 720

Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Ala Ile Ile Met  
725 730 735

Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu Thr  
740 745 750

Pro Glu Glu Val Val Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro Leu Cys Arg  
755 760 765

Pro Leu Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Val Glu Cys Ile Leu Leu Met  
770 775 780

Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg Pro Ser Met Asp His  
785 790 795 800

Thr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn Ile  
805 810 815

Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu Glu  
820 825 830

Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Gln Lys  
835 840 845

Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val Ala Glu Ala  
850 855 860

Leu Lys Thr Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Gln Val Thr  
865 870 875 880

Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met Ser  
885 890 895

Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu Phe  
900 905 910

035893

Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly  
 915 920 925

Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln Arg  
 930 935 940

His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ala Val  
 945 950 955 960

Gly Thr Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile Arg  
 965 970 975

Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu Thr  
 980 985 990

Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser A  
 995 1000 1005

Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Leu Ser  
 1010 1015 1020

Thr Val Gly Ile Leu Arg Ala Leu Asp Ser Gly Tyr Gln Val Glu  
 1025 1030 1035

Leu Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Ala Glu Asp Thr  
 1040 1045 1050

Phe Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn Lys Pro Ile Pro Lys  
 1055 1060 1065

Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ser Ser Asn His Gly Ile Ser Leu  
 1070 1075 1080

Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Arg Lys Leu Glu Lys Ala Arg  
 1085 1090 1095

Pro Gly Gln Phe Ser  
 1100

<210> 2  
 <211> 1108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ser Ala Trp Leu Leu Pro Ala Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gly Phe  
 1 5 10 15

Cys Val Pro Ala Arg Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Arg Val Leu Arg

035893

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







035893

1040 1045 1050  
 Glu Asp Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg Leu Gly Phe Asn Lys Pro  
 1055 1060 1065  
 Ile Pro Lys Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn His Gly  
 1070 1075 1080  
 Ile Ser Leu Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Lys Lys Leu Glu  
 1085 1090 1095  
 Lys Ala Arg Pro Gly Gln Phe Thr Gly Lys  
 1100 1105  
 <210> 3  
 <211> 1108  
 <212> BEJOK  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 3  
 Met Ser Ala Trp Leu Leu Pro Ala Gly Gly Phe Pro Gly Ala Gly Phe  
 1 5 10 15  
 Cys Ile Pro Ala Trp Gln Ser Arg Ser Ser Leu Ser Arg Val Leu Arg  
 20 25 30  
 Trp Pro Gly Pro Gly Leu Pro Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro  
 35 40 45  
 Ser Pro Ser Ala Phe Ser Ala Val Phe Lys Val Gly Val Leu Gly Pro  
 50 55 60  
 Trp Ala Cys Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Arg Leu Ala Thr Asp Arg Leu Asn Arg Asp Leu Ala Leu Asp Gly Gly  
 85 90 95  
 Pro Trp Phe Glu Val Thr Leu Leu Pro Glu Pro Cys Leu Thr Pro Gly  
 100 105 110  
 Ser Leu Gly Ala Val Ser Ser Ala Leu Thr Arg Val Ser Gly Leu Val  
 115 120 125  
 Gly Pro Val Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala Gln  
 130 135 140  
 Glu Ala Gly Val Ala Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Gly Thr Arg Ala  
 145 150 155 160

035893

Ala Gly Thr Thr Ala Pro Ala Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu Tyr  
165 170 175

Val Leu Leu Lys Ala Phe Arg Trp Ala Arg Val Ala Leu Ile Thr Ala  
180 185 190

Pro Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Gly Arg Ala Leu Ser Thr Ala Leu  
195 200 205

Arg Ala Arg Gly Leu Pro Val Ala Leu Val Thr Ser Met Val Pro Ser  
210 215 220

Asp Leu Ser Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Arg Ile Arg Asp Gly Pro  
225 230 235 240

Arg Val Arg Val Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly  
245 250 255

Glu Glu Gln Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Thr  
260 265 270

Asp Gly Ser Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr Ala Leu  
275 280 285

Ser Pro Gly Pro Glu Ala Leu Ala Ala Phe Val Asn Ser Ser Lys Leu  
290 295 300

Arg Arg Ala His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg Arg Cys Pro Pro  
305 310 315 320

Gly Gly Ser Val Gln Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu His Gln Glu  
325 330 335

Leu Pro Leu Asp Leu Asp Leu Lys Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr  
340 345 350

Ile Tyr Asp Ala Val Phe Leu Leu Ala Gly Gly Val Thr Arg Ala Arg  
355 360 365

Ala Ala Val Gly Gly Gly Trp Val Ser Gly Ala Ser Val Ala Arg Gln  
370 375 380

Met Arg Glu Ala Gln Val Phe Gly Phe Cys Gly Ile Leu Gly Arg Thr  
385 390 395 400

Glu Glu Pro Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Glu Arg  
405 410 415

035893

Leu Phe Thr Thr His Leu Leu Asp Pro Val Leu Gly Ser Leu Arg Ser  
420 425 430

Ala Gly Thr Pro Val His Phe Pro Arg Gly Ala Pro Ala Pro Gly Pro  
435 440 445

Asp Pro Ser Cys Trp Phe Asp Pro Asp Val Ile Cys Asn Gly Gly Val  
450 455 460

Glu Pro Gly Leu Val Phe Val Gly Phe Leu Leu Val Ile Val Val Gly  
465 470 475 480

Leu Thr Gly Ala Phe Leu Ala His Tyr Leu Arg His Arg Leu Leu His  
485 490 495

Met Gln Met Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu Glu Asp  
500 505 510

Val Thr Phe Leu His Pro Gln Gly Gly Ser Ser Arg Lys Val Ala Gln  
515 520 525

Gly Ser Arg Ser Ser Leu Ala Thr Arg Ser Thr Ser Asp Ile Arg Ser  
530 535 540

Val Pro Ser Gln Pro Gln Glu Ser Thr Asn Ile Gly Leu Tyr Glu Gly  
545 550 555 560

Asp Trp Val Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Glu His His Met Ala Ile  
565 570 575

Arg Pro Ala Thr Lys Met Ala Phe Ser Lys Leu Arg Glu Leu Arg His  
580 585 590

Glu Asn Val Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Gly Thr Ala Asp  
595 600 605

Ser Pro Ala Thr Pro Gly Glu Gly Ile Leu Ala Val Val Ser Glu His  
610 615 620

Cys Ala Arg Gly Ser Leu His Asp Leu Leu Ala Gln Arg Asp Ile Lys  
625 630 635 640

Leu Asp Trp Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly  
645 650 655

Met Arg Tyr Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser  
660 665 670

035893

Arg Asn Cys Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Val Thr Asp His  
675 680 685

Gly His Gly Arg Leu Leu Glu Ala Gln Arg Val Leu Pro Glu Pro Pro  
690 695 700

Ser Ala Glu Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro  
705 710 715 720

Ala Leu Glu Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Gly  
725 730 735

Ile Ile Met Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Thr Pro Tyr Ala Met Leu  
740 745 750

Glu Leu Thr Pro Glu Glu Val Ile Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro  
755 760 765

Leu Cys Arg Pro Leu Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Met Glu Cys Ile  
770 775 780

Gln Leu Met Ala Gln Cys Trp Ala Glu His Pro Glu Leu Arg Pro Ser  
785 790 795 800

Met Asp Leu Thr Phe Asp Leu Phe Lys Gly Ile Asn Lys Gly Arg Lys  
805 810 815

Thr Asn Ile Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser  
820 825 830

Asn Leu Glu Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Gln Glu  
835 840 845

Lys Gln Lys Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val  
850 855 860

Ala Glu Ala Leu Lys Met Gly Thr Ser Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu  
865 870 875 880

Glu Val Thr Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser  
885 890 895

Ala Met Ser Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr  
900 905 910

Thr Leu Phe Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu  
915 920 925

035893

Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn  
 930 935 940

Gly Gln Arg His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile Leu  
 945 950 955 960

Ser Ala Val Gly Ser Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val  
 965 970 975

Arg Ile Arg Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val  
 980 985 990

Gly Leu Thr Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr  
 995 1000 1005

Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val  
 1010 1015 1020

Asn Met Ser Thr Val Arg Ile Leu Arg Ala Leu Asp Gln Gly Phe  
 1025 1030 1035

Gln Met Glu Cys Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Val  
 1040 1045 1050

Glu Asp Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg Val Gly Phe Asn Lys Pro  
 1055 1060 1065

Ile Pro Lys Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn His Gly  
 1070 1075 1080

Ile Ser Leu Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Lys Lys Leu Glu  
 1085 1090 1095

Lys Ala Arg Pro Gly Gln Phe Thr Gly Lys  
 1100 1105

<210> 4  
 <211> 1110  
 <212> BEJOK  
 <213> Bos taurus

<400> 4

Met Thr Ala Cys Thr Phe Leu Ala Gly Gly Leu Arg Asp Pro Gly Leu  
 1 5 10 15

Cys Ala Pro Thr Arg Trp Ser Pro Ser Pro Pro Gly Leu Pro Pro Ile  
 20 25 30

035893

Pro Pro Arg Pro Arg Leu Arg Leu Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu  
35 40 45

Leu Leu Pro Arg Ser Val Leu Ser Ala Val Phe Thr Val Gly Val Leu  
50 55 60

Gly Pro Trp Ala Cys Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ala Arg Pro Asp Leu  
65 70 75 80

Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ser Arg Leu Asn His Ala Ala Ala Leu Glu  
85 90 95

Gly Gly Pro Arg Phe Glu Val Ala Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr  
100 105 110

Pro Gly Ser Leu Gly Ala Val Ser Ser Ala Leu Thr Arg Val Ser Gly  
115 120 125

Leu Val Gly Pro Val Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu  
130 135 140

Ala Gln Glu Ala Gly Val Ala Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Gly Thr  
145 150 155 160

Arg Ala Ala Gly Thr Thr Ala Pro Val Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala  
165 170 175

Leu Tyr Ala Leu Leu Arg Ala Phe Arg Trp Ala His Val Ala Leu Val  
180 185 190

Thr Ala Pro Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Gly His Ala Leu Ser Thr  
195 200 205

Ala Leu Arg Ala Arg Gly Leu Pro Val Ala Leu Val Thr Ser Met Glu  
210 215 220

Pro Ser Asp Leu Ser Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Arg Val Gln Asp  
225 230 235 240

Gly Pro Arg Val Arg Ala Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu  
245 250 255

Gly Gly Glu Glu Gln Arg Cys Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly  
260 265 270

Leu Ala Asp Gly Ser Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr  
275 280 285

035893

Ala Leu Ser Pro Gly Pro Asp Ala Leu Ala Val Leu Ala Asn Ser Ser  
 290 295 300

Gln Leu Arg Lys Ala His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys  
 305 310 315 320

Pro Leu Gly Gly Ser Val Arg Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu His  
 325 330 335

Arg Glu Leu Pro Leu Asp Leu Asn Leu Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe  
 340 345 350

Gly Thr Ile Tyr Asp Ser Val Phe Leu Leu Ala Gly Gly Val Ala Arg  
 355 360 365

Ala Arg Val Ala Ala Gly Gly Gly Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala  
 370 375 380

Arg His Ile Arg Asp Ala Arg Val Pro Gly Phe Cys Gly Ala Leu Gly  
 385 390 395 400

Gly Ala Glu Glu Pro Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Thr Gly  
 405 410 415

Asp Gln Leu Phe Ala Thr Tyr Val Leu Asp Pro Thr Gln Gly Phe Phe  
 420 425 430

His Ser Ala Gly Thr Pro Val His Phe Pro Lys Gly Gly Arg Gly Pro  
 435 440 445

Gly Pro Asp Pro Ser Cys Trp Phe Asp Pro Asp Thr Ile Cys Asn Gly  
 450 455 460

Gly Val Glu Pro Ser Val Val Phe Ile Gly Phe Leu Leu Val Val Gly  
 465 470 475 480

Met Gly Leu Ala Gly Ala Phe Leu Ala His Tyr Cys Arg His Arg Leu  
 485 490 495

Leu His Ile Gln Met Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu  
 500 505 510

Asp Asp Ile Thr Phe Leu His Pro His Gly Gly Asn Ser Arg Lys Val  
 515 520 525

Ala Gln Gly Ser Arg Thr Ser Leu Ala Ala Arg Ser Ile Ser Asp Val  
 530 535 540

## 035893

Arg Ser Ile His Ser Gln Leu Pro Asp Tyr Thr Asn Ile Gly Leu Tyr  
 545 550 555 560

Glu Gly Asp Trp Val Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Asp Arg His Ile  
 565 570 575

Ala Ile Arg Pro Ala Thr Lys Met Ala Phe Ser Lys Ile Arg Glu Leu  
 580 585 590

Arg His Glu Asn Val Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Gly Gly  
 595 600 605

Ala Gly Gly Pro Ala Ala Pro Gly Glu Gly Val Leu Ala Val Val Ser  
 610 615 620

Glu His Cys Ala Arg Gly Ser Leu Gln Asp Leu Leu Ala Gln Arg Asp  
 625 630 635 640

Ile Lys Leu Asp Trp Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile  
 645 650 655

Lys Gly Ile Arg Tyr Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu  
 660 665 670

Lys Ser Arg Asn Cys Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Val Thr  
 675 680 685

Asp His Gly His Gly Arg Leu Leu Glu Ala Gln Arg Val Leu Pro Glu  
 690 695 700

Pro Pro Ser Ala Glu Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg  
 705 710 715 720

Asp Pro Val Leu Glu Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser  
 725 730 735

Leu Gly Ile Ile Met Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala  
 740 745 750

Met Leu Glu Leu Thr Pro Glu Glu Val Val Lys Arg Val Gln Ser Pro  
 755 760 765

Pro Pro Leu Cys Arg Pro Ser Val Ser Ile Asp Gln Ala Pro Met Glu  
 770 775 780

Cys Ile Gln Leu Met Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg  
 785 790 795 800

035893

Pro Ser Met Asp Arg Thr Phe Glu Leu Phe Lys Ser Ile Asn Lys Gly  
805 810 815

Arg Lys Met Asn Ile Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr  
820 825 830

Ser Ser Asn Leu Glu Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu  
835 840 845

Leu Glu Lys Gln Lys Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro  
850 855 860

Ser Val Ala Glu Ala Leu Lys Met Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr  
865 870 875 880

Phe Glu Glu Val Thr Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr  
885 890 895

Ile Ser Ala Met Ser Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp  
900 905 910

Leu Tyr Thr Leu Phe Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys  
915 920 925

Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln  
930 935 940

Arg Asn Gly His Arg His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ala Leu Asp  
945 950 955 960

Ile Leu Ser Ala Val Gly Thr Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val  
965 970 975

Pro Val Arg Ile Arg Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly  
980 985 990

Val Val Gly Leu Thr Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val  
995 1000 1005

Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile  
1010 1015 1020

His Val Asn Arg Ser Thr Val Gln Ile Leu Ser Ala Leu Asn Glu  
1025 1030 1035

Gly Phe Leu Thr Glu Val Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys  
1040 1045 1050

035893

Gly Ala Glu Glu Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn  
 1055 1060 1065

Lys Pro Ile Pro Lys Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn  
 1070 1075 1080

His Gly Ile Ser Leu His Glu Ile Pro Pro Asp Arg Arg Gln Lys  
 1085 1090 1095

Leu Glu Lys Ala Arg Pro Gly Gln Phe Ser Gly Lys  
 1100 1105 1110

<210> 5  
 <211> 1109  
 <212> BEJOK  
 <213> Canis familiaris

<400> 5

Met Ser Ala Cys Ala Leu Leu Ala Gly Gly Leu Pro Asp Pro Arg Leu  
 1 5 10 15

Cys Ala Pro Ala Arg Trp Ala Arg Ser Pro Pro Gly Val Pro Gly Ala  
 20 25 30

Pro Pro Trp Pro Gln Pro Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 35 40 45

Leu Pro Pro Ser Ala Leu Ser Ala Val Phe Thr Val Gly Val Leu Gly  
 50 55 60

Pro Trp Ala Cys Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala  
 65 70 75 80

Ala Arg Leu Ala Ala Ala Arg Leu Asn Arg Asp Ala Ala Leu Glu Asp  
 85 90 95

Gly Pro Arg Phe Glu Val Thr Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr Pro  
 100 105 110

Gly Ser Leu Gly Ala Val Ser Ser Ala Leu Gly Arg Val Ser Gly Leu  
 115 120 125

Val Gly Pro Val Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala  
 130 135 140

Gln Glu Ala Gly Val Ala Leu Val Pro Trp Ser Cys Pro Gly Thr Arg  
 145 150 155 160

035893

Ala Gly Gly Thr Thr Ala Pro Ala Gly Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu  
165 170 175

Tyr Ala Leu Leu Arg Ala Phe Arg Trp Ala Arg Val Ala Leu Ile Thr  
180 185 190

Ala Pro Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Gly Arg Ala Leu Ser Ala Ala  
195 200 205

Leu Arg Ala Arg Gly Leu Pro Val Ala Leu Val Thr Thr Met Glu Pro  
210 215 220

Ser Asp Leu Ser Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Arg Val Gln Asp Gly  
225 230 235 240

Pro Arg Val Arg Ala Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly  
245 250 255

Gly Glu Glu Gln Arg Cys Leu Leu Gln Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu  
260 265 270

Ala Asp Gly Ser Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr Ala  
275 280 285

Leu Ser Pro Gly Pro Glu Ala Leu Ala Val Leu Ala Asn Ser Ser Gln  
290 295 300

Leu Arg Arg Ala His Asp Ala Val Leu Ile Leu Thr Arg His Cys Pro  
305 310 315 320

Pro Gly Gly Ser Val Met Asp Asn Leu Arg Arg Ala Gln Glu His Gln  
325 330 335

Glu Leu Pro Ser Asp Leu Asp Leu Gln Gln Val Ser Pro Phe Phe Gly  
340 345 350

Thr Ile Tyr Asp Ala Val Leu Leu Leu Ala Gly Gly Val Ala Arg Ala  
355 360 365

Arg Ala Ala Ala Gly Gly Gly Trp Val Ser Gly Ala Thr Val Ala His  
370 375 380

His Ile Pro Asp Ala Gln Val Pro Gly Phe Cys Gly Thr Leu Gly Gly  
385 390 395 400

Ala Gln Glu Pro Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp  
405 410 415

035893

Arg Leu Phe Ala Thr Tyr Met Leu Asp Pro Thr Arg Gly Ser Leu Leu  
420 425 430

Ser Ala Gly Thr Pro Val His Phe Pro Arg Gly Gly Gly Thr Pro Gly  
435 440 445

Ser Asp Pro Ser Cys Trp Phe Glu Pro Gly Val Ile Cys Asn Gly Gly  
450 455 460

Val Glu Pro Gly Leu Val Phe Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met  
465 470 475 480

Gly Leu Thr Gly Ala Phe Leu Ala His Tyr Leu Arg His Arg Leu Leu  
485 490 495

His Ile Gln Met Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu Asp  
500 505 510

Asp Val Thr Phe Leu His Pro His Gly Gly Ser Thr Arg Lys Val Val  
515 520 525

Gln Gly Ser Arg Ser Ser Leu Ala Ala Arg Ser Thr Ser Asp Ile Arg  
530 535 540

Ser Val Pro Ser Gln Pro Leu Asp Asn Ser Asn Ile Gly Leu Phe Glu  
545 550 555 560

Gly Asp Trp Val Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Asp Gln His Ile Ala  
565 570 575

Ile Arg Pro Ala Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Arg Glu Leu Arg  
580 585 590

His Glu Asn Val Val Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Gly Ser Gly Gly  
595 600 605

Ala Gly Gly Ser Ala Ala Gly Glu Gly Val Leu Ala Val Val Ser Glu  
610 615 620

His Cys Ala Arg Gly Ser Leu His Asp Leu Leu Ala Gln Arg Asp Ile  
625 630 635 640

Lys Leu Asp Trp Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys  
645 650 655

Gly Met Arg Tyr Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys  
660 665 670

035893

Ser Arg Asn Cys Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Val Thr Asp  
675 680 685

His Gly His Ala Arg Leu Met Glu Ala Gln Arg Val Leu Leu Glu Pro  
690 695 700

Pro Ser Ala Glu Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp  
705 710 715 720

Pro Ala Leu Glu Arg Arg Gly Thr Leu Pro Gly Asp Val Phe Ser Leu  
725 730 735

Gly Ile Ile Met Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala Met  
740 745 750

Leu Glu Leu Thr Pro Glu Glu Val Val Glu Arg Val Arg Ser Pro Pro  
755 760 765

Pro Leu Cys Arg Pro Ser Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Val Glu Cys  
770 775 780

Ile Gln Leu Met Lys Gln Cys Trp Ala Glu His Pro Asp Leu Arg Pro  
785 790 795 800

Ser Leu Gly His Ile Phe Asp Gln Phe Lys Ser Ile Asn Lys Gly Arg  
805 810 815

Lys Thr Asn Ile Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser  
820 825 830

Ser Asn Leu Glu Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu  
835 840 845

Glu Lys Gln Lys Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser  
850 855 860

Val Ala Glu Ala Leu Lys Met Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe  
865 870 875 880

Glu Glu Val Thr Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile  
885 890 895

Ser Ala Met Ser Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu  
900 905 910

Tyr Thr Leu Phe Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val  
915 920 925

035893

Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg  
 930 935 940

Asn Gly Gln Arg His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ala Leu Asp Ile  
 945 950 955 960

Leu Ser Ala Val Gly Ser Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro  
 965 970 975

Val Arg Ile Arg Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val  
 980 985 990

Val Gly Leu Thr Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn  
 995 1000 1005

Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His  
 1010 1015 1020

Val Asn Met Ser Thr Val Arg Ile Leu His Ala Leu Asp Glu Gly  
 1025 1030 1035

Phe Gln Thr Glu Val Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly  
 1040 1045 1050

Ala Glu Asp Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn Lys  
 1055 1060 1065

Pro Ile Pro Lys Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn His  
 1070 1075 1080

Gly Ile Ser Leu Gln Glu Ile Pro Leu Asp Arg Arg Trp Lys Leu  
 1085 1090 1095

Glu Lys Ala Arg Pro Gly Gln Phe Ser Gly Lys  
 1100 1105

<210> 6  
 <211> 1103  
 <212> BEMOK  
 <213> Macaca mulatta

<400> 6

Met Thr Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gly Gly Leu Pro Asp Pro Arg Leu  
 1 5 10 15

Cys Gly Pro Ala Arg Trp Ala Pro Ala Leu Pro Arg Leu Pro Arg Ala  
 20 25 30

035893

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

035893

Pro Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asn Ser Ser Gln Leu Arg Arg Ala  
290 295 300

His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Pro Ser Glu Gly Ser  
305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu Arg Arg Glu Leu Pro Ser  
325 330 335

Asp Leu Asn Leu Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp  
340 345 350

Ala Val Phe Leu Leu Val Arg Gly Val Ala Glu Ala Arg Ala Ala Ala  
355 360 365

Gly Gly Arg Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg His Val Trp Asp  
370 375 380

Ala Gln Val Pro Gly Phe Cys Gly Asp Leu Gly Gly Asp Glu Glu Pro  
385 390 395 400

Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Val Gly Asp Arg Leu Phe Ala  
405 410 415

Thr Tyr Met Leu Asp Pro Thr Arg Gly Ser Leu Leu Ser Ala Gly Thr  
420 425 430

Pro Met His Phe Pro Arg Gly Gly Ser Ala Pro Gly Pro Asp Pro Ser  
435 440 445

Cys Trp Phe Asp Pro Asn Asn Ile Cys Gly Gly Gly Leu Glu Pro Gly  
450 455 460

Leu Val Phe Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met Gly Leu Ala Gly  
465 470 475 480

Ala Phe Leu Ala His Tyr Val Arg His Gln Leu Leu His Ile Gln Met  
485 490 495

Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Val Asp Asp Ile Thr Phe  
500 505 510

Leu His Pro His Gly Gly Thr Ser Arg Lys Val Ala Gln Gly Ser Arg  
515 520 525

Ser Ser Leu Ala Ala Arg Ser Met Ser Asp Val Arg Ser Gly Pro Ser  
530 535 540

035893

Gln Pro Thr Asp Ser Pro Asn Val Gly Val Tyr Glu Gly Asp Arg Val  
545 550 555 560

Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Asp Gln His Ile Ala Ile Arg Pro Ala  
565 570 575

Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Gln Glu Leu Arg His Glu Asn Val  
580 585 590

Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Gln Gly Ala Glu Gly Pro Ala  
595 600 605

Ala Leu Trp Glu Gly Asn Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Thr Arg  
610 615 620

Gly Ser Leu Gln Asp Leu Leu Ala Gln Arg Glu Ile Lys Leu Asp Trp  
625 630 635 640

Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Ile Arg Tyr  
645 650 655

Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn Cys  
660 665 670

Ile Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp His Gly His Gly  
675 680 685

Arg Leu Leu Glu Ala Gln Lys Val Leu Pro Glu Pro Pro Arg Ala Glu  
690 695 700

Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Glu  
705 710 715 720

Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Ala Ile Ile Met  
725 730 735

Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu Thr  
740 745 750

Pro Glu Glu Val Val Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro Leu Cys Arg  
755 760 765

Pro Leu Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Val Glu Cys Ile His Leu Met  
770 775 780

Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg Pro Ser Met Asp His  
785 790 795 800

035893

Thr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn Ile  
805 810 815

Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu Glu  
820 825 830

Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Gln Lys  
835 840 845

Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val Ala Glu Ala  
850 855 860

Leu Lys Thr Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Gln Val Thr  
865 870 875 880

Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met Ser  
885 890 895

Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu Phe  
900 905 910

Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly  
915 920 925

Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln Arg  
930 935 940

His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ala Val  
945 950 955 960

Gly Thr Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile Arg  
965 970 975

Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu Thr  
980 985 990

Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg  
995 1000 1005

Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Leu Ser  
1010 1015 1020

Thr Val Gly Ile Leu Arg Ala Leu Asp Ser Gly Tyr Gln Val Glu  
1025 1030 1035

Leu Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Ala Glu Asp Thr  
1040 1045 1050

035893

Phe Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn Lys Pro Ile Pro Lys  
 1055 1060 1065

Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ser Ser Asn His Gly Ile Ser Leu  
 1070 1075 1080

Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Arg Lys Leu Glu Lys Ala Arg  
 1085 1090 1095

Pro Gly Gln Phe Ser  
 1100

<210> 7  
 <211> 1103  
 <212> BEJOK  
 <213> Pongo pygmaeus

<400> 7

Met Thr Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gly Gly Leu Pro Asp Pro Gly Leu  
 1 5 10 15

Cys Gly Pro Ala Arg Trp Ala Pro Ser Leu Pro Arg Leu Pro Arg Ala  
 20 25 30

Leu Pro Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro  
 35 40 45

Ala Leu Ser Ala Val Phe Thr Val Gly Val Leu Gly Pro Trp Ala Cys  
 50 55 60

Asp Pro Ile Phe Ser Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala Ala Arg Leu Ala  
 65 70 75 80

Ala Ala Arg Leu Asn Arg Asp Pro Gly Leu Ala Gly Gly Pro Arg Phe  
 85 90 95

Glu Val Ala Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr Pro Gly Ser Leu Gly  
 100 105 110

Ala Val Ser Ser Ala Leu Ala Arg Val Ser Gly Leu Val Gly Pro Val  
 115 120 125

Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala Asp Asn Pro Gly  
 130 135 140

Ile Ala Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Trp Thr Gln Ala Glu Gly Thr  
 145 150 155 160

035893

Thr Ala Pro Cys Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu Tyr Ala Leu Leu  
165 170 175

Arg Ala Phe Gly Trp Ala Arg Val Ala Leu Val Thr Ala Pro Gln Asp  
180 185 190

Leu Trp Val Glu Ala Gly Arg Ser Leu Ser Thr Ala Leu Arg Ala Arg  
195 200 205

Gly Leu Pro Val Ala Ser Val Thr Ser Met Glu Pro Leu Asp Leu Ser  
210 215 220

Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Lys Val Arg Asp Gly Pro Arg Val Thr  
225 230 235 240 245

Ala Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln  
245 250 255

Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Thr Asp Gly Ser  
260 265 270

Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Ile His Tyr Ala Leu Ser Pro Gly  
275 280 285

Pro Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asn Ser Ser Gln Leu Arg Arg Ala  
290 295 300

His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Pro Ser Glu Gly Ser  
305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu Arg Arg Glu Leu Pro Ser  
325 330 335

Asp Leu Asn Leu Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp  
340 345 350

Ala Val Phe Leu Leu Ala Arg Gly Val Ala Glu Ala Trp Ala Ala Ala  
355 360 365

Gly Gly Arg Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg His Ile Arg Asp  
370 375 380

Ala Gln Val Pro Gly Phe Cys Gly Asp Leu Gly Gly Asp Gly Glu Pro  
385 390 395 400

Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp Arg Leu Phe Ala  
405 410 415

035893

Thr Tyr Met Leu Asp Pro Ala Arg Gly Ser Phe Leu Ser Ala Gly Thr  
420 425 430

Arg Met His Phe Pro Arg Gly Gly Ser Ala Pro Gly Pro Asp Pro Ser  
435 440 445

Cys Trp Phe Asp Pro Asn Asn Ile Cys Gly Gly Gly Leu Glu Pro Gly  
450 455 460

Leu Val Phe Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met Gly Leu Ala Gly  
465 470 475 480

Ala Phe Leu Ala His Tyr Val Arg His Arg Leu Leu His Ile Gln Met  
485 490 495

Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Val Asn Asp Ile Thr Phe  
500 505 510

Leu His Pro His Gly Gly Thr Ser Arg Lys Val Ala Gln Gly Ser Arg  
515 520 525

Ser Ser Leu Ala Ala Arg Ser Met Ser Asp Ile Arg Ser Gly Pro Ser  
530 535 540

Gln Pro Leu Asp Ser Pro Asn Val Gly Val Tyr Glu Gly Asp Arg Val  
545 550 555 560

Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Asp Gln His Ile Ala Ile Arg Pro Ala  
565 570 575

Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Gln Glu Leu Arg His Glu Asn Val  
580 585 590

Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Arg Gly Ala Glu Gly Pro Ala  
595 600 605

Ala Leu Trp Glu Gly Asn Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Thr Arg  
610 615 620

Gly Ser Leu Gln Asp Leu Leu Ser Gln Arg Glu Ile Lys Leu Asp Trp  
625 630 635 640

Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Ile Arg Tyr  
645 650 655

Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn Cys  
660 665 670

035893

Ile Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp His Gly His Gly  
675 680 685

Arg Leu Leu Glu Ala Gln Lys Val Leu Pro Glu Pro Pro Arg Ala Glu  
690 695 700

Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Glu  
705 710 715 720

Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Ala Ile Ile Met  
725 730 735

Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu Thr  
740 745 750

Pro Glu Glu Val Val Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro Leu Cys Arg  
755 760 765

Pro Leu Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Val Glu Cys Ile His Leu Met  
770 775 780

Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg Pro Ser Met Asp His  
785 790 795 800

Thr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn Ile  
805 810 815

Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu Glu  
820 825 830

Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Gln Lys  
835 840 845

Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val Ala Glu Ala  
850 855 860

Leu Lys Thr Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Gln Val Thr  
865 870 875 880

Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met Ser  
885 890 895

Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu Phe  
900 905 910

Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly  
915 920 925

035893

Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln Arg  
930 935 940

His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ala Val  
945 950 955 960

Gly Thr Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile Arg  
965 970 975

Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu Thr  
980 985 990

Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg  
995 1000 1005

Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Leu Ser  
1010 1015 1020

Thr Val Gly Ile Leu Arg Ala Leu Asp Ser Gly Tyr Gln Val Glu  
1025 1030 1035

Leu Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Ala Glu Asp Thr  
1040 1045 1050

Phe Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn Lys Pro Ile Pro Lys  
1055 1060 1065

Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ser Ser Asn His Gly Ile Ser Leu  
1070 1075 1080

Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Arg Lys Leu Glu Lys Ala Arg  
1085 1090 1095

Pro Gly Gln Phe Ser  
1100

<210> 8  
<211> 1103  
<212> BEJOK  
<213> Callithrix jacchus

<400> 8

Met Thr Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gly Gly Leu Pro Asp Pro Gly Leu  
1 5 10 15

Cys Gly Pro Ala Arg Trp Ala Pro Ala Leu Ser Arg Leu Pro Arg Ala  
20 25 30

035893

Leu Pro Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro  
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Gln Phe Thr Val Gly Val Leu Gly Pro Trp Ala Cys  
50 55 60

Asp Pro Ile Phe Ser Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala Ala Arg Leu Ala  
65 70 75 80

Ala Ala Arg Leu Asn Arg Asp Pro Ser Leu Ala Gly Gly Pro Arg Phe  
85 90 95

Glu Val Ala Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr Pro Gly Ser Leu Gly  
100 105 110

Ala Val Ser Ser Ala Leu Ala Arg Val Ser Gly Leu Val Gly Pro Val  
115 120 125

Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala Glu Glu Ala Gly  
130 135 140

Ile Ala Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Gly Thr Gln Ala Ala Gly Thr  
145 150 155 160

Thr Ala Pro Val Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu Tyr Ala Leu Leu  
165 170 175

Arg Ala Phe Gly Trp Ala Arg Val Ala Leu Val Thr Ala Pro Gln Asp  
180 185 190

Leu Trp Val Glu Ala Gly Leu Ser Leu Ser Thr Ala Leu Arg Ala Arg  
195 200 205

Gly Leu Pro Val Val Ser Val Thr Ser Met Glu Pro Leu Asp Leu Ser  
210 215 220

Gly Ala Arg Glu Ala Leu Arg Lys Val Arg Asn Gly Pro Arg Val Thr  
225 230 235 240

Ala Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln  
245 250 255

Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Thr Asp Gly Ser  
260 265 270

Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Ile His Tyr Ala Leu Ser Pro Gly  
275 280 285

035893

Arg Glu Ala Leu Ala Ala Leu Val Asn Ser Ser Gln Leu Arg Arg Ala  
290 295 300

His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Ser Ser Glu Gly Ser  
305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Leu Arg Lys Ala Gln Gln Arg Arg Glu Leu Pro Ser  
325 330 335

Asp Leu Asn Leu Glu Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp  
340 345 350

Ala Val Val Leu Leu Ala Arg Gly Val Ala Asp Ala Arg Ala Ala Val  
355 360 365

Gly Gly Arg Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg His Val Trp Asp  
370 375 380

Ala Gln Ala Ser Gly Phe Cys Gly Asp Leu Gly Arg Asp Glu Glu Pro  
385 390 395 400

Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp Gln Leu Phe Ala  
405 410 415

Thr Tyr Met Leu Asp Pro Ala Arg Gly Ser Leu Leu Ser Ala Gly Thr  
420 425 430

Pro Met His Phe Pro Arg Gly Gly Pro Ala Pro Gly Pro Asp Pro Ser  
435 440 445

Cys Trp Phe Asp Pro Asn Asn Ile Cys Asp Gly Gly Leu Glu Pro Gly  
450 455 460

Phe Ile Phe Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met Gly Leu Ala Gly  
465 470 475 480

Ala Leu Leu Ala His Tyr Val Arg His Gln Leu Leu His Ile Gln Met  
485 490 495

Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Val Asp Asp Ile Thr Phe  
500 505 510

Leu His Pro His Gly Gly Ala Ser Arg Lys Val Ala Gln Gly Ser Arg  
515 520 525

Ser Ser Leu Ala Ala His Ser Thr Ser Asp Ile Arg Ser Gly Pro Ser  
530 535 540

035893

Gln Pro Ser Asp Ser Pro Asn Ile Gly Val Tyr Glu Gly Asp Arg Val  
545 550 555 560

Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Glu Gln His Ile Ala Ile Arg Pro Ala  
565 570 575

Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Gln Glu Leu Arg His Glu Asn Val  
580 585 590

Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Ala Gln Gly Ala Glu Gly Pro Ala  
595 600 605

Ala Leu Trp Glu Gly Asn Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Thr Arg  
610 615 620

Gly Ser Leu Gln Asp Leu Leu Ala Gln Arg Glu Ile Lys Leu Asp Trp  
625 630 635 640

Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Ile Arg Tyr  
645 650 655

Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn Cys  
660 665 670

Ile Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp His Gly His Gly  
675 680 685

Arg Leu Leu Glu Ala Gln Lys Val Leu Pro Glu Pro Pro Lys Ala Glu  
690 695 700

Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Glu  
705 710 715 720

Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Gly Ile Ile Met  
725 730 735

Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ala Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu Thr  
740 745 750

Pro Asp Glu Val Val Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro Leu Cys Arg  
755 760 765

Pro Phe Val Ser Met Asp Gln Ala Pro Val Glu Cys Ile His Leu Met  
770 775 780

Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg Pro Ser Met Asp Leu  
785 790 795 800

035893

Thr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn Ile  
805 810 815

Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu Glu  
820 825 830

Asp Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Gln Lys  
835 840 845

Thr Asp Arg Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val Ala Glu Ala  
850 855 860

Leu Lys Thr Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Gln Val Thr  
865 870 875 880

Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met Ser  
885 890 895

Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu Phe  
900 905 910

Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly  
915 920 925

Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln Arg  
930 935 940

His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ala Val  
945 950 955 960

Gly Thr Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile Arg  
965 970 975

Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu Thr  
980 985 990

Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg  
995 1000 1005

Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Leu Ser  
1010 1015 1020

Thr Val Gly Ile Leu Arg Ala Leu Asp Ser Gly Tyr Gln Val Glu  
1025 1030 1035

Leu Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Ala Glu Asp Thr  
1040 1045 1050

035893

Phe Trp Leu Val Gly Arg Arg Gly Phe Asn Lys Pro Ile Pro Lys  
 1055 1060 1065

Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn His Gly Ile Ser Leu  
 1070 1075 1080

Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg Arg Lys Leu Glu Lys Ala Arg  
 1085 1090 1095

Pro Gly Gln Phe Ser  
 1100

<210> 9  
 <211> 1012  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Ailuropoda melanoleuca

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (80)..(88)  
 <223> Хаа может быть любой образующейся в природе

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (964)..(971)  
 <223> Хаа может быть любой образующейся в природе

<400> 9

Met Arg Ala Cys Ala Leu Leu Ala Gly Gly Leu Pro Tyr Pro Arg Leu  
 1 5 10 15

Cys Ala Pro Thr Arg Trp Ala Pro Ala Arg Pro Gly Val Ser Arg Ala  
 20 25 30

Leu Pro Trp Pro Arg Pro Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 35 40 45

Arg Pro Pro Ser Val Leu Ser Ala Val Phe Thr Val Gly Val Leu Gly  
 50 55 60

Pro Trp Ala Cys Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ala Arg Pro Asp Leu Xaa  
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ala Leu Tyr Val Leu Leu Arg  
 85 90 95

Ala Phe Arg Trp Ala Arg Val Ala Leu Val Thr Ala Pro Gln Asp Leu  
 100 105 110

035893

Trp Val Glu Ala Gly Arg Ala Leu Ser Ala Ala Leu Arg Ala Arg Gly  
115 120 125

Leu Pro Val Ala Leu Val Thr Thr Met Glu Pro Ser Asp Leu Ser Gly  
130 135 140

Ala Arg Glu Ala Leu Arg Arg Val Gln His Gly Pro Arg Val Ser Ala  
145 150 155 160

Val Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln Arg  
165 170 175

Cys Leu Leu Gln Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Ala Asp Gly Ser Leu  
180 185 190

Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr Ala Leu Ser Pro Gly Pro  
195 200 205

Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Asn Ser Ser Gln Leu Arg Arg Ala His  
210 215 220

Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Pro Pro Gly Gly Ser Val  
225 230 235 240 245

Met Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu Arg Gln Glu Leu Pro Ser Asp  
245 250 255

Leu Asn Leu Glu Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp Ala  
260 265 270

Val Phe Leu Leu Ala Gly Gly Val Ala Arg Ala Arg Ala Ala Ala Ala  
275 280 285

Asp Ser Arg Val Pro Gly Phe Cys Gly Ala Leu Gly Gly Ala Glu Glu  
290 295 300

Pro Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp Arg Phe Phe  
305 310 315 320

Ala Thr Tyr Val Leu Asp Pro Thr Arg Gly Ser Leu His Ser Ala Gly  
325 330 335

Thr Pro Val His Phe Pro Arg Gly Gly Gly Ala Pro Gly Pro Asp Pro  
340 345 350

Ser Cys Trp Phe Glu Pro Asp Ser Ile Cys Asn Gly Gly Val Glu Pro  
355 360 365

## 035893

Gly Leu Val Phe Thr Gly Phe Leu Leu Val Val Gly Met Gly Leu Met  
 370 375 380

Gly Ala Phe Leu Ala His Tyr Val Arg His Arg Leu Leu His Ile Gln  
 385 390 395 400

Met Val Ser Gly Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu Asp Asp Ile Thr  
 405 410 415

Phe Leu His Pro Gln Gly Gly Ser Ala Arg Lys Val Val Gln Gly Ser  
 420 425 430

Arg Ser Ser Leu Ala Ala Arg Ser Thr Ser Asp Val Arg Ser Val Pro  
 435 440 445

Ser Gln Pro Ser Asp Gly Gly Asn Ile Gly Leu Tyr Glu Gly Asp Trp  
 450 455 460

Val Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Ser Gln His Ile Ala Ile Arg Pro  
 465 470 475 480

Ala Thr Lys Thr Ala Phe Ser Lys Leu Arg Glu Leu Arg His Glu Asn  
 485 490 495

Val Ala Leu Tyr Leu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ser  
 500 505 510

Ala Ala Ala Gly Gly Gly Met Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Thr  
 515 520 525

Arg Gly Ser Leu His Asp Leu Leu Ala Gln Arg Asp Ile Lys Leu Asp  
 530 535 540

Trp Met Phe Lys Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Met Arg  
 545 550 555 560

Tyr Leu His His Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn  
 565 570 575

Cys Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Val Thr Asp His Gly His  
 580 585 590

Gly Arg Leu Leu Glu Ala Gln Lys Val Leu Ala Glu Pro Pro Ser Ala  
 595 600 605

Glu Asp Gln Leu Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu  
 610 615 620

035893

Glu Arg Arg Gly Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Gly Ile Ile  
 625 630 635 640

Met Gln Glu Val Val Cys Arg Ser Ser Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu  
 645 650 655

Ser Ala Arg Glu Val Val Gln Arg Val Arg Ser Pro Pro Pro Leu Cys  
 660 665 670

Arg Pro Ser Val Ser Val Asp Gln Ala Pro Ala Glu Cys Ile Gln Leu  
 675 680 685

Met Lys Gln Cys Trp Ala Glu Gln Pro Glu Leu Arg Pro Ser Leu Asp  
 690 695 700

Arg Thr Phe Asp Gln Phe Lys Ser Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn  
 705 710 715 720

Ile Ile Asp Ser Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu  
 725 730 735

Glu Gly Leu Ile Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Arg  
 740 745 750

Lys Thr Asp Arg Leu Arg Ala Ala Ser Leu Pro Ser Ser Val Ala Glu  
 755 760 765

Ala Leu Lys Met Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Glu Val  
 770 775 780

Thr Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met  
 785 790 795 800

Ser Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu  
 805 810 815

Phe Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile  
 820 825 830

Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln  
 835 840 845

Arg His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala  
 850 855 860

Val Gly Ser Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile  
 865 870 875 880

035893

Arg Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu  
885 890 895

Thr Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser  
900 905 910

Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Met Ser  
915 920 925

Thr Val Arg Ile Leu Arg Ala Leu Asp Glu Gly Phe Gln Thr Glu Val  
930 935 940

Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Ala Glu Asp Thr Tyr Trp  
945 950 955 960

Leu Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ile Pro Lys Pro  
965 970 975

Pro Asp Leu Gln Pro Gly Ala Ser Asn His Gly Ile Ser Leu Gln Glu  
980 985 990

Ile Pro Leu Asp Arg Arg Gln Lys Leu Glu Lys Ala Arg Pro Gly Gln  
995 1000 1005

Phe Ser Gly Lys  
1010

<210> 10  
<211> 1093  
<212> BEJOK  
<213> Monodelphis domestica

<400> 10

Met Leu Val Pro Ser Ile Asn Gly Leu Phe His His Pro Pro Trp Cys  
1 5 10 15

Phe Pro Pro Leu Pro Leu Pro Leu Phe Phe Leu Phe Leu Leu Leu  
20 25 30

Leu Pro Val Pro Val Leu Pro Ala Thr Phe Thr Ile Gly Val Leu Gly  
35 40 45

Pro Trp Ser Cys Asp Pro Ile Phe Ser Arg Ala Arg Pro Asp Leu Ala  
50 55 60

Ala Arg Leu Ala Ala Thr Arg Met Asn His Asp Gln Ala Leu Glu Gly  
65 70 75 80

Gly Pro Trp Phe Glu Val Ile Leu Leu Pro Glu Pro Cys Arg Thr Ser

035893

85 90 95

Gly Ser Leu Gly Ala Leu Ser Pro Ser Leu Ala Arg Val Ser Gly Leu  
100 105 110

Val Gly Pro Val Asn Pro Ala Ala Cys His Pro Ala Glu Leu Leu Ala  
115 120 125

Gln Glu Ala Gly Val Pro Leu Val Pro Trp Gly Cys Pro Gln Gly Lys  
130 135 140

Ala Arg Thr Thr Ala Pro Ala Leu Pro Leu Ala Leu Asp Ala Leu Tyr  
145 150 155 160

Ala Leu Leu Arg Ala Phe His Trp Ala Lys Val Ala Leu Ile Thr Ala  
165 170 175

Pro Gln Asp Leu Trp Val Glu Ala Gly Gln Ala Leu Ala Gly Gly Leu  
180 185 190

Arg Ser Arg Gly Leu Pro Val Ala Met Val Thr Ser Leu Glu Thr Thr  
195 200 205

Asp Leu Glu Ser Ala Lys Asn Ala Leu Lys Arg Val Arg Asp Gly Pro  
210 215 220

Lys Val Lys Val Leu Ile Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Leu Leu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Val  
245 250 255

Glu Gly Thr Met Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr Ala Leu  
260 265 270

Pro Pro Gly Pro Glu Ala Leu Arg Pro Ile Thr Asn Ser Ser Arg Leu  
275 280 285

Arg Lys Ala His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg Tyr Cys Pro Lys  
290 295 300

Gly Ser Val Ser Ala Ser Leu Arg Gln Ala Gln Glu His Arg Glu Leu  
305 310 315 320

Pro Leu Asp Leu Lys Pro Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile  
325 330 335

Tyr Asp Ala Ile Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Val Ala Gly Ala Gln Val

035893

340 345 350  
 Ala Gly Gly Gly Gly Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg His Ile  
 355 360 365  
 Pro Asn Thr Leu Val Ser Gly Phe Cys Gly Asp Leu Gly Gly Thr Lys  
 370 375 380  
 Glu Pro Pro Phe Val Leu Leu Asp Thr Asp Gly Met Arg Asp Gln Leu  
 385 390 395 400  
 Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Asp Pro Ala Gln Gly Val Leu His His Ala  
 405 410 415  
 Gly Asn Pro Ile His Phe Pro His Gly Gly Gln Gly Pro Gly Pro Asp  
 420 425 430  
 Pro Pro Cys Trp Phe Asp Pro Asn Val Ile Cys Ser Gly Gly Ile Glu  
 435 440 445  
 Pro Arg Phe Ile Leu Leu Val Ile Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Leu  
 450 455 460  
 Val Val Ala Thr Leu Ala Tyr Tyr Val Arg Arg Gln Leu Leu His Ala  
 465 470 475 480  
 Gln Met Val Ser Gly Pro Asn Lys Met Ile Leu Thr Leu Glu Asp Ile  
 485 490 495  
 Thr Phe Phe Pro Arg Gln Gly Ser Ser Ser Arg Lys Ala Thr Glu Gly  
 500 505 510  
 Ser Arg Ser Ser Leu Ile Ala His Ser Ala Ser Asp Met Arg Ser Ile  
 515 520 525  
 Pro Ser Gln Pro Pro Asp Asn Ser Asn Ile Gly Met Tyr Glu Gly Asp  
 530 535 540  
 Trp Val Trp Leu Lys Lys Phe Pro Gly Glu His Tyr Thr Glu Ile Arg  
 545 550 555 560  
 Pro Ala Thr Lys Met Ala Phe Ser Lys Leu Arg Glu Leu Arg His Glu  
 565 570 575  
 Asn Val Ala Val Gln Met Gly Leu Phe Leu Ala Gly Ser Met Glu Gly  
 580 585 590  
 Ala Ala Ala Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ile Leu Ala Val Val Ser Glu



035893

Glu Glu Val Thr Leu Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile  
 865 870 875 880

Ser Ala Met Ser Glu Pro Ile Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu  
 885 890 895

Tyr Thr Leu Phe Asp Ala Ile Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val  
 900 905 910

Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Lys Arg  
 915 920 925

Asn Gly Gln Arg His Ala Ala Glu Ile Ala Asn Met Ser Leu Asp Ile  
 930 935 940

Leu Ser Ser Val Gly Ser Phe Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro  
 945 950 955 960

Val Arg Ile Arg Ile Gly Leu His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val  
 965 970 975

Val Gly Leu Thr Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn  
 980 985 990

Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His V  
 995 1000 1005

Asn Leu Ser Thr Val Lys Ile Leu Gln Gly Leu Asn Glu Gly Phe  
 1010 1015 1020

Gln Ile Glu Ile Arg Gly Arg Thr Glu Leu Lys Gly Lys Gly Val  
 1025 1030 1035

Glu Asp Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg Lys Gly Phe Asp Lys Pro  
 1040 1045 1050

Ile Pro Ile Pro Pro Asp Leu Leu Pro Gly Ala Ser Asn His Gly  
 1055 1060 1065

Ile Ser Leu Gln Glu Ile Pro Glu Asp Arg Arg Lys Lys Leu Glu  
 1070 1075 1080

Lys Ala Arg Pro Gly Gln Pro Leu Gly Lys  
 1085 1090

<210> 11  
 <211> 862  
 <212> BEJOK  
 <213> Equus caballus  
 <400> 11

035893

Met Val Met His Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln Arg Cys Leu  
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Ala Glu Glu Leu Gly Leu Ala Asp Gly Ser Leu Val Phe  
 20 25 30

Leu Pro Phe Asp Thr Leu His Tyr Ala Leu Ser Pro Gly Pro Glu Ala  
 35 40 45

Leu Ala Val Leu Ala Asn Asn Ser Gln Leu Arg Arg Ala His Asp Ala  
 50 55 60

Val Leu Thr Leu Thr Arg His Cys Pro Leu Gly Gly Ser Val Leu Asp  
 65 70 75 80

Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu His Gln Glu Leu Pro Ser Asp Leu Asn  
 85 90 95

Leu Gln Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp Ala Val Tyr  
 100 105 110

Leu Leu Ala Gly Gly Val Ala Arg Ala Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ser  
 115 120 125

Trp Val Ser Gly Ala Ala Val Ala His His Val Arg Asp Ala Gln Val  
 130 135 140

Pro Gly Phe Cys Gly Ala Leu Gly Gly Ala Glu Glu Pro Gln Phe Val  
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Thr Asp Ala Ala Gly Asp Arg Leu Phe Ala Thr Tyr Met  
 165 170 175

Leu Asp Pro Thr Arg Gly Ser Leu Trp Ser Ala Gly Thr Pro Val His  
 180 185 190

Phe Pro Arg Gly Gly Arg Gly Pro Gly Pro Asp Pro Trp Cys Trp Phe  
 195 200 205

Asp Pro Asp Asp Ile Cys Asn Gly Gly Val Glu Pro Arg Leu Val Phe  
 210 215 220

Ile Gly Phe Leu Leu Ala Val Gly Met Gly Leu Ala Gly Val Phe Leu  
 225 230 235 240

035893

Ala His Tyr Val Arg His Arg Leu Leu His Ile Gln Met Ala Ser Gly  
 245 250 255

Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu Asp Asp Ile Thr Phe Leu His Pro  
 260 265 270

Gln Gly Gly Ser Ser Arg Lys Val Ile Gln Gly Ser Arg Ser Ser Leu  
 275 280 285

Ala Ala Arg Ser Val Ser Asp Ile Arg Ser Val Pro Ser Gln Pro Met  
 290 295 300

Asp Ser Ser Asn Ile Gly Leu Tyr Glu Gly Asp Trp Val Trp Leu Lys  
 305 310 315 320

Lys Phe Pro Gly Asp Gln His Ile Ala Ile Arg Pro Ala Thr Lys Thr  
 325 330 335

Ala Phe Ser Lys Leu Arg Glu Leu Arg His Glu Asn Val Ala Leu Tyr  
 340 345 350

Leu Gly Leu Phe Leu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Ala Ala Ala Pro Arg  
 355 360 365

Glu Gly Met Leu Ala Val Val Ser Glu His Cys Ala Arg Gly Ser Leu  
 370 375 380

His Asp Leu Leu Ala Gln Arg Asp Ile Lys Leu Asp Trp Met Phe Lys  
 385 390 395 400

Ser Ser Leu Leu Leu Asp Leu Ile Lys Gly Met Arg Tyr Leu His His  
 405 410 415

Arg Gly Val Ala His Gly Arg Leu Lys Ser Arg Asn Cys Val Val Asp  
 420 425 430

Gly Arg Phe Val Leu Lys Val Thr Asp His Gly His Gly Arg Leu Leu  
 435 440 445

Glu Ala Gln Lys Val Leu Pro Glu Pro Pro Ser Ala Glu Asp Gln Leu  
 450 455 460

Trp Thr Ala Pro Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ala Leu Glu Arg Gln Gly  
 465 470 475 480

Thr Leu Ala Gly Asp Val Phe Ser Leu Gly Ile Ile Ile Gln Glu Val  
 485 490 495

035893

Val Cys Arg Ser Thr Pro Tyr Ala Met Leu Glu Leu Thr Pro Glu Glu  
500 505 510

Val Val Gln Arg Leu Gln Ser Pro Pro Pro Leu Cys Arg Pro Ser Val  
515 520 525

Ser Met Asp Gln Ala Pro Met Glu Cys Ile Gln Leu Met Lys Gln Cys  
530 535 540

Trp Ala Glu Gln Pro Asp Leu Arg Pro Ser Met Asp Arg Thr Phe Asp  
545 550 555 560

Leu Phe Lys Ser Ile Asn Lys Gly Arg Lys Thr Asn Ile Ile Asp Ser  
565 570 575

Met Leu Arg Met Leu Glu Gln Tyr Ser Ser Asn Leu Glu Asp Leu Ile  
580 585 590

Arg Glu Arg Thr Glu Glu Leu Glu Leu Glu Lys Gln Lys Thr Asp Arg  
595 600 605

Leu Leu Thr Gln Met Leu Pro Pro Ser Val Ala Glu Ala Leu Lys Met  
610 615 620

Gly Thr Pro Val Glu Pro Glu Tyr Phe Glu Glu Val Thr Leu Tyr Phe  
625 630 635 640

Ser Asp Ile Val Gly Phe Thr Thr Ile Ser Ala Met Ser Glu Pro Ile  
645 650 655

Glu Val Val Asp Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Leu Phe Asp Ala Ile  
660 665 670

Ile Gly Ser His Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr  
675 680 685

Met Val Ala Ser Gly Leu Pro Gln Arg Asn Gly Gln Arg His Ala Ala  
690 695 700

Glu Ile Ala Asn Met Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala Val Gly Ser Phe  
705 710 715 720

Arg Met Arg His Met Pro Glu Val Pro Val Arg Ile Arg Ile Gly Leu  
725 730 735

His Ser Gly Pro Cys Val Ala Gly Val Val Gly Leu Thr Met Pro Arg  
740 745 750

035893

Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser  
755 760 765

Thr Gly Leu Pro Tyr Arg Ile His Val Asn Met Ser Thr Val Arg Ile  
770 775 780

Leu Arg Ala Leu Asp Glu Gly Phe Gln Val Glu Val Arg Gly Arg Thr  
785 790 795 800

Glu Leu Lys Gly Lys Gly Val Glu Asp Thr Tyr Trp Leu Val Gly Arg  
805 810 815

Arg Gly Phe Asn Lys Pro Ile Pro Lys Pro Pro Asp Leu Gln Pro Gly  
820 825 830

Ala Ser Asn His Gly Ile Ser Leu Gln Glu Ile Pro Pro Glu Arg Arg  
835 840 845

Gln Lys Leu Glu Lys Ala Arg Pro Gly Gln Phe Ser Gly Lys  
850 855 860

<210> 12  
<211> 292  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggccccttg 60  
gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaate ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120  
ttctaqcacc ttcttqccac tcctaagcgt cctccqtgac cccqctqgg atttagcctg 180  
gtgctgtgtc agccccggtc tcccaggggc ttcccagtg tccccaggaa ccctcgacag 240  
ggccccgtct ctctcgtcca gcaagggcag ggacgggcca caggccaagg gc 292

<210> 13  
<211> 953  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Гибридный промотор CDA/CMV

<400> 13  
aattcggtag cctagttatt aatagtaate aattacgggg tcattagttc atagcccata 60  
tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccacga 120  
ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt 180  
ccattgacgt caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 240

## 035893

gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc cgcctggca 300  
 ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 360  
 catcgtatt accatggctg aggtgagccc cacgtttcgc ttcactctcc ccatctcccc 420  
 cccctcccc cccccaattt tgtatttatt tttttttaa ttattttgtg cagcgatggg 480  
 ggcggggggg gggggggggc gcgcgccagg cggggcggg cggggcgagg ggcggggcgg 540  
 ggcgaggcgg agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt 600  
 tatggcgagg cggcgcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc ggcggggagt 660  
 cgctgcgacg ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgc gcctcgcgc cgcgcgcccc 720  
 ggctctgact gaccgcgcta ctcccacagg tgagcggggc ggacggccct tctcctcgg 780  
 gctgtaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 840  
 ttgaggggct cggggagcta gagcctctgc taaccatggt catgccttct tcttttctct 900  
 acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aag 953

<210> 14  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Прямой праймер

<400> 14 36  
 aaaagcggcc gcatgagcgc ttggtcctg cagccc

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Обратный праймер

<400> 15 36  
 aaaagcggcc gctcacttcc cagtaaaactg gcctgg

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Прямой праймер

<400> 16 24  
 gacccttctt gctggttcga tcca

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> ДНК

035893

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Обратный праймер

<400> 17

ctgcatgtgt agcagcctgt gcctc

25

<210> 18

<211> 992

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность

<400> 18

Met Ser Ala Ala Gly Gly Leu Gly Cys Pro Arg Ala Pro Ser Ile Pro  
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ser Ala Val Phe Val Gly  
20 25 30

Val Leu Gly Pro Trp Ala Cys Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ala Arg Pro  
35 40 45

Asp Ile Ala Ala Arg Leu Ala Ala Arg Leu Asn Ala Leu Asp Gly Gly  
50 55 60

Pro Arg Phe Glu Val Ala Leu Leu Pro Glu Pro Cys Thr Pro Gly Ser  
65 70 75 80

Leu Gly Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg Val Ser Gly Leu Val Gly Pro  
85 90 95

Val Asn Pro Ala Ala Cys Arg Pro Ala Glu Leu Leu Ala Gln Glu Ala  
100 105 110

Gly Val Ala Leu Val Pro Trp Gly Val Pro Gly Thr Arg Ala Ala Gly  
115 120 125

Thr Thr Ala Pro Val Thr Pro Ala Ala Asp Ala Leu Tyr Leu Leu Arg  
130 135 140

Ala Phe Arg Trp Ala Val Ala Leu Ile Thr Ala Pro Gln Asp Leu Trp  
145 150 155 160

Val Glu Ala Gly Ala Leu Ser Thr Ala Leu Arg Ala Arg Gly Leu Pro  
165 170 175

Val Ala Leu Val Thr Ser Met Glu Val Arg Val Ile Met Val Met Gly

035893

180 185 190  
 Ser Val Leu Leu Gly Gly Glu Glu Gln Arg Leu Leu Glu Ala Ala Glu  
 195 200 205  
 Glu Leu Ala Leu Asp Gly Ser Leu Val Phe Leu Pro Phe Asp Thr Leu  
 210 215 220  
 His Trp Ala Leu Ser Pro Gly Pro Asp Ala Ile Ala Asn Ser Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Lys Ala His Asp Ala Val Leu Thr Leu Thr Arg Cys Pro Gly  
 245 250 255  
 Gly Ser Val Asp Ser Leu Arg Arg Ala Gln Glu His Glu Leu Pro Leu  
 260 265 270  
 Asp Leu Asn Leu Gln Val Ser Pro Leu Phe Gly Thr Ile Tyr Asp Ala  
 275 280 285  
 Val Phe Leu Leu Ala Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Gly Gly Trp Val  
 290 295 300  
 Ser Gly Ala Ala Val Ala Arg Ile Arg Asp Ala Val Gly Phe Cys Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Glu Glu Pro Ser Phe Val Leu Ile Asp Thr Asp Ala Ser Gly  
 325 330 335  
 Asp Gln Leu Phe Ala Thr His Leu Leu Asp Pro Gly Ser Ala Gly Thr  
 340 345 350  
 Pro Met His Phe Pro Lys Gly Gly Ala Pro Gly Pro Asp Pro Ser Cys  
 355 360 365  
 Trp Phe Asp Pro Asp Ile Cys Asn Gly Gly Val Glu Pro Leu Val Phe  
 370 375 380  
 Ile Gly Phe Leu Leu Val Ile Gly Met Gly Leu Gly Ala Phe Leu Ala  
 385 390 395 400  
 Phe Leu Ala His Tyr Arg His Arg Leu Leu His Ile Gln Met Ser Gly  
 405 410 415  
 Pro Asn Lys Ile Ile Leu Thr Leu Asp Asp Ile Thr Phe Leu His Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ser Arg Lys Val Gln Gly Ser Arg Ser Ser Leu Ala Arg Ser





## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор (rAAV), включающий полинуклеотид, который содержит специфичный в отношении зрительного фоторецептора промотор человеческой родопсинкиназы, функционально связанный с сегментом нуклеиновой кислоты, которая кодирует биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека, который включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 90% смежным 80 аминокислотам последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанный вектор способен предохранять или восстанавливать опосредованную колбочками функцию глаза млекопитающего.

2. Вектор rAAV по п.1, где биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Вектор rAAV по п.1, где биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Вектор rAAV по п.1, где биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека содержит 100 смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Вектор rAAV по п.1, где биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека содержит 125 смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 1.

6. Вектор rAAV по п.1, где биологически активный, специфичный в отношении сетчатки полипептид гуанилатциклазы человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

7. Вектор rAAV по любому из пп.1-6, в котором специфичный в отношении зрительного фоторецептора промотор человеческой родопсинкиназы содержит по меньшей мере 30 смежных пар нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 12.

8. Вектор rAAV по любому из пп.1-6, в котором специфичный в отношении зрительного фоторецептора промотор человеческой родопсинкиназы содержит по меньшей мере 40 смежных пар нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 12.

9. Вектор rAAV по любому из пп.1-6, в котором специфичный в отношении зрительного фоторецептора промотор человеческой родопсинкиназы содержит по меньшей мере 60 смежных пар нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 12.

10. Вектор rAAV по любому из пп.1-6, в котором специфичный в отношении зрительного фоторецептора промотор человеческой родопсинкиназы содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

11. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий энхансер или последовательность интрона млекопитающего.

12. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, который является рекомбинантным вектором аденоассоциированного вируса серотипа 5 (rAAV5).

13. Вектор rAAV по любому из пп.1-11, который является рекомбинантным вектором аденоассоциированного вируса серотипа 8 (rAAV8).

14. Вектор rAAV по п.13, который является рекомбинантным вектором аденоассоциированного вируса серотипа 8 (Y733F).

15. Вектор rAAV по любому из пп.1-14, где у млекопитающего имеется риск развития или диагностирован дефицит биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в клетках глаза по сравнению с его уровнем у нормального млекопитающего.

16. Вектор rAAV по любому из пп.1-14, где млекопитающее является новорожденным человеком, человеком в неонатальном, детском или юношеском возрасте, у которого имеется риск развития или диагностирована наследственная дистрофия сетчатки, такая как врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).

17. Вектор rAAV по любому из пп.1-14, где у млекопитающего имеется риск развития или диагностировано заболевание, расстройство, дисфункция или аномальное состояние глаза, обусловленные дефицитом биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в клетках глаза по сравнению с его уровнем у нормального млекопитающего.

18. Вектор rAAV по п.17, где заболеванием, расстройством, дисфункцией или аномальным состоянием является врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).

19. Композиция, которая способна предохранять или восстанавливать опосредованную колбочками функцию глаза млекопитающего, содержащая:

(1) вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов;

(2) фармацевтически приемлемый буфер, носитель, наполнитель или разбавитель.

20. Композиция по п.19, дополнительно содержащая липид, липосому, липидный комплекс, этосому, ниосому, наночастицу, микрочастицу, липосферу, нанокapsулу или любую их комбинацию.

21. Композиция по п.19 или 20, составленная в форме, подходящей для введения в глаз млекопи-

тающего.

22. Композиция по любому из пп.19-21, где у млекопитающего имеется риск развития или диагностирован дефицит биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы.

23. Композиция по любому из пп.19-21, где млекопитающее является новорожденным человеком, человеком в неонатальном, детском или юношеском возрасте, у которого имеется риск развития или диагностирована наследственная дистрофия сетчатки, такая как врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).

24. Композиция по любому из пп.19-21, где у млекопитающего имеется риск развития или диагностировано заболевание, расстройство, дисфункция или аномальное состояние глаза, обусловленные дефицитом биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в клетках глаза по сравнению с его уровнем у нормального млекопитающего.

25. Композиция по п.24, где заболеванием, расстройством, дисфункцией или аномальным состоянием является врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).

26. Способ предотвращения, лечения или облегчения симптомов заболевания, расстройства, дисфункции или аномального состояния глаза млекопитающего, обусловленных дефицитом биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в клетках глаза по сравнению с его уровнем у нормального млекопитающего, где способ включает введение в клетки глаза млекопитающего, нуждающегося в этом, эффективного количества вектора по любому из пп.1-14 или композиции по любому из пп.19-21.

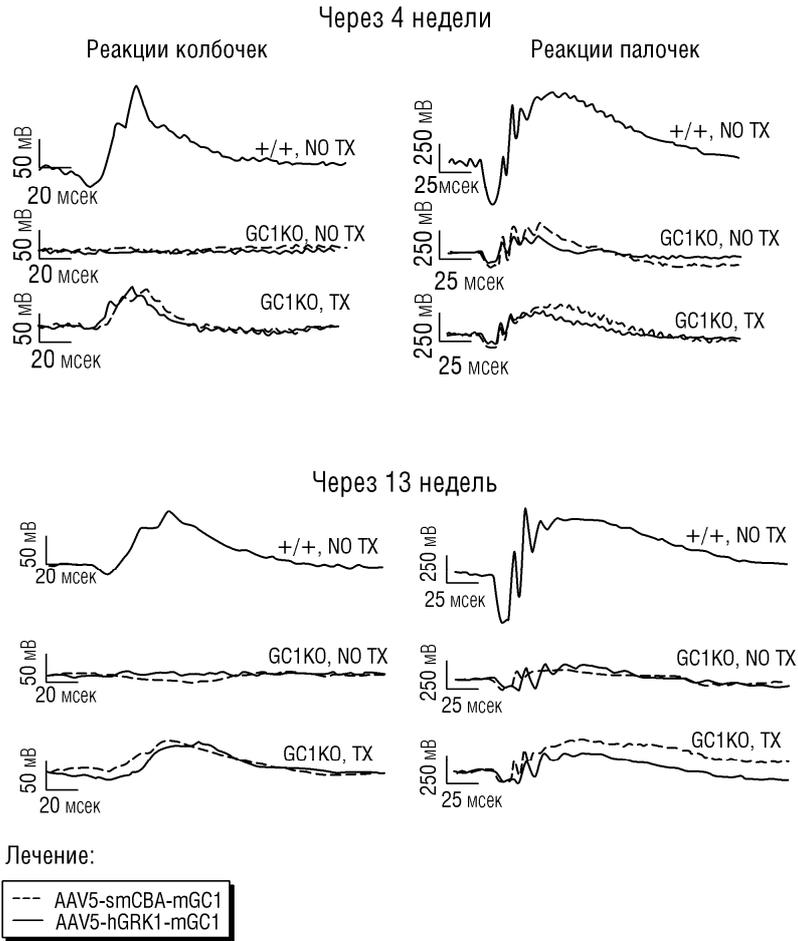
27. Способ по п.26, где указанный вектор вводят в клетки глаза млекопитающего *ex vivo* или *in vitro*, после чего указанные клетки вводят в участок внутри одного или обоих глаз млекопитающего путем прямой инъекции в сетчатку или в окружающую ее ткань.

28. Способ по любому из пп.26, 27, где млекопитающее страдает врожденным амаврозом Лебера типа 1 (LCA1).

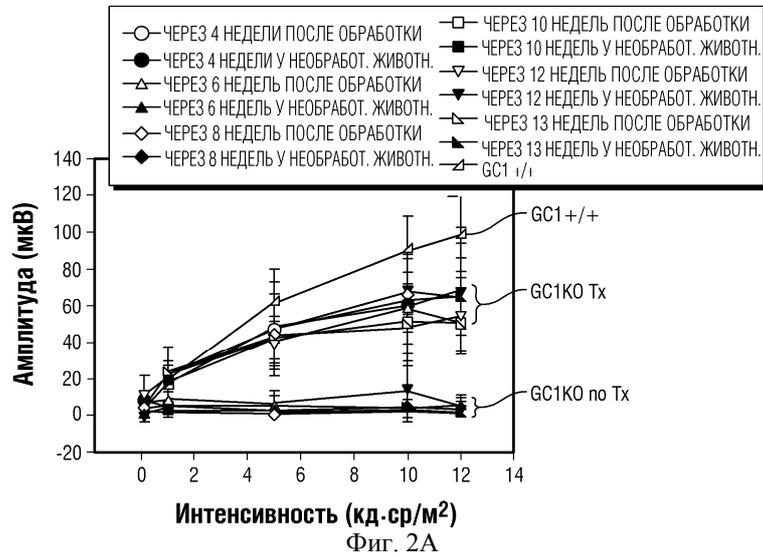
29. Способ повышения уровня биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в одной или нескольких клетках сетчатки млекопитающего, у которого предполагается наличие LCA1, либо диагностирован LCA1, либо есть риск развития LCA1, где способ включает введение вектора по любому из пп.1-14 или композиции по любому из пп.19-21 в клетки сетчатки млекопитающего в количестве и в течение периода, эффективных для увеличения уровня биологически активного, специфичного в отношении сетчатки полипептида гуанилатциклазы в одной или нескольких клетках сетчатки млекопитающего.

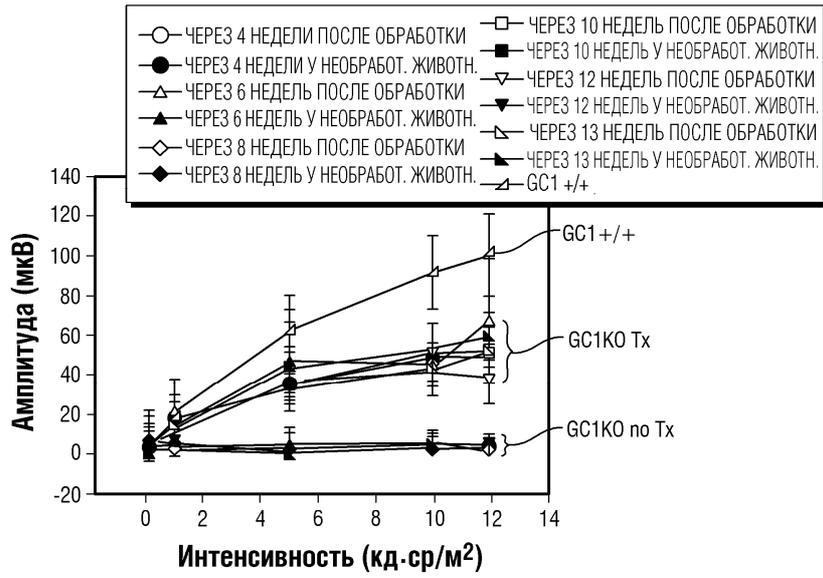
30. Способ лечения или облегчения одного или нескольких симптомов дистрофии сетчатки у млекопитающего, включающий прямое введение в сетчатку или субретинальное пространство млекопитающего вектора по любому из пп.1-14 или композиции по любому из пп.19-21 в количестве и в течение периода, эффективных для лечения или облегчения одного или нескольких симптомов дистрофии сетчатки у млекопитающего.

31. Способ по п.30, где у млекопитающего диагностирован врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).

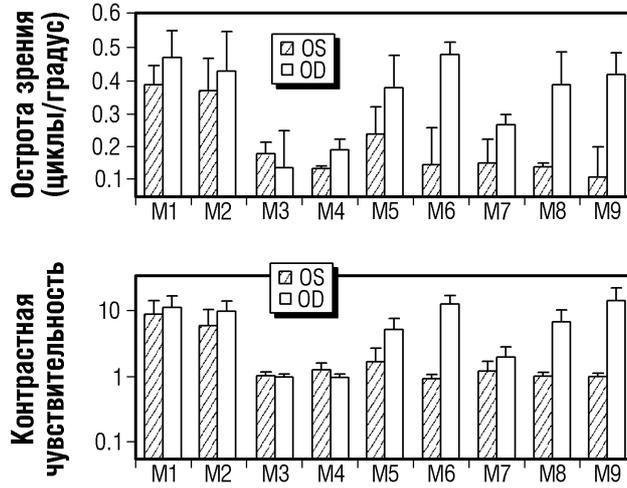


Фиг. 1

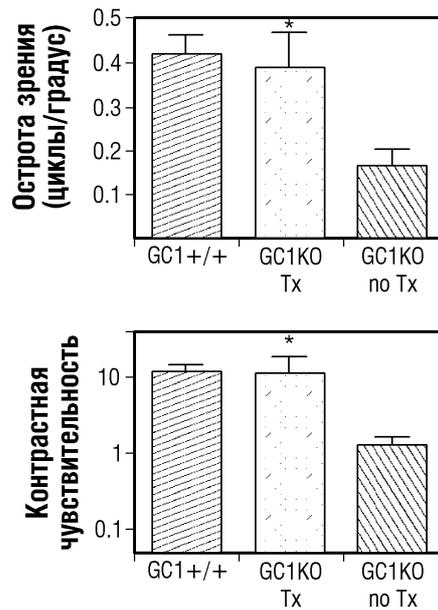




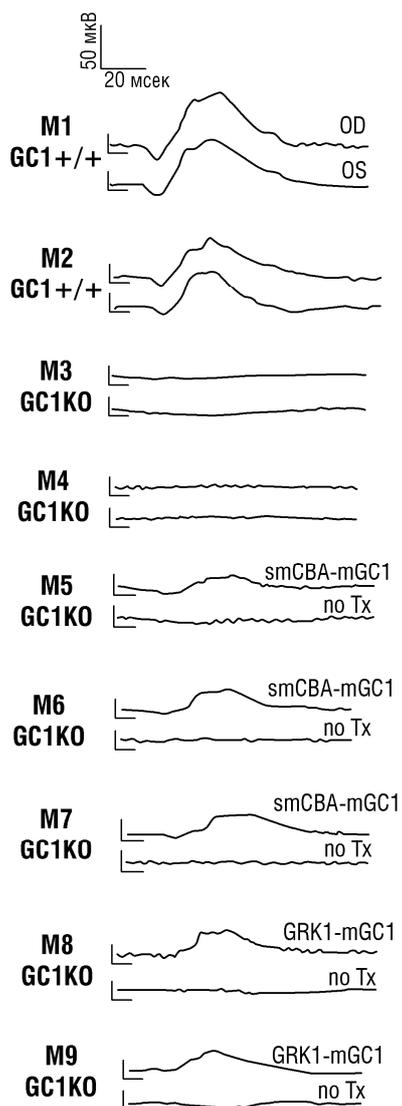
Фиг. 2В



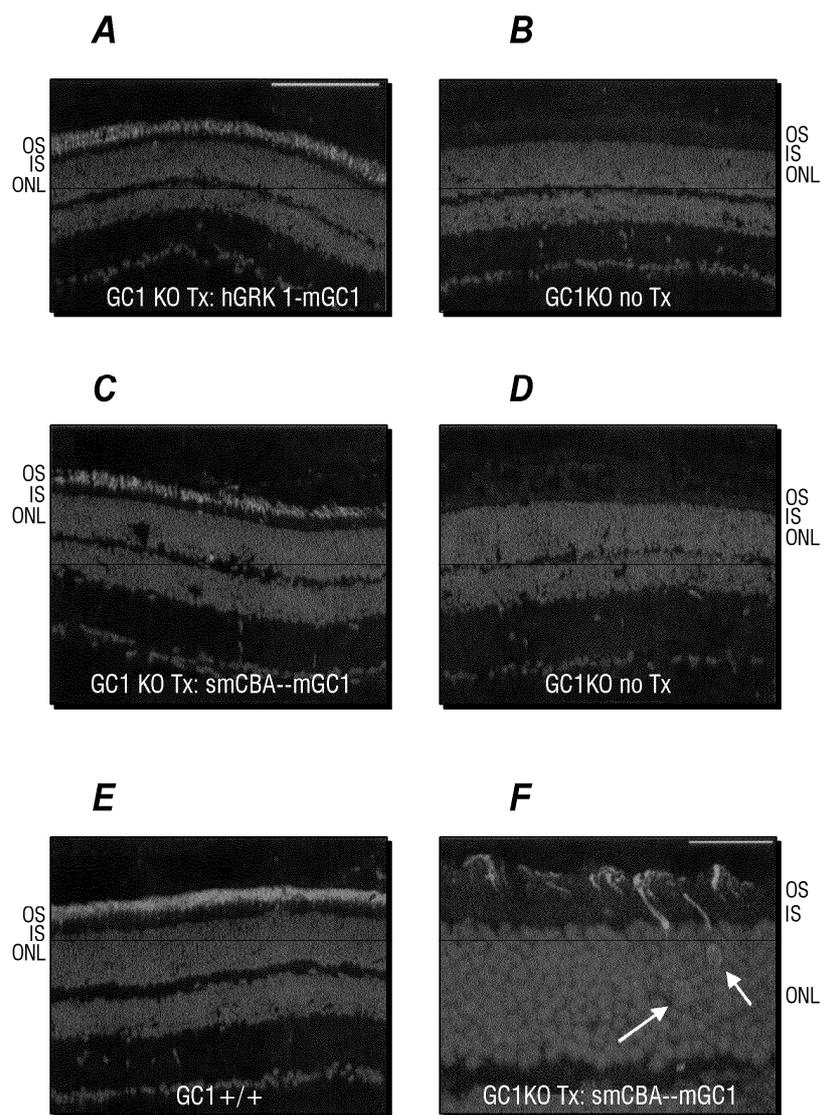
Фиг. 3А



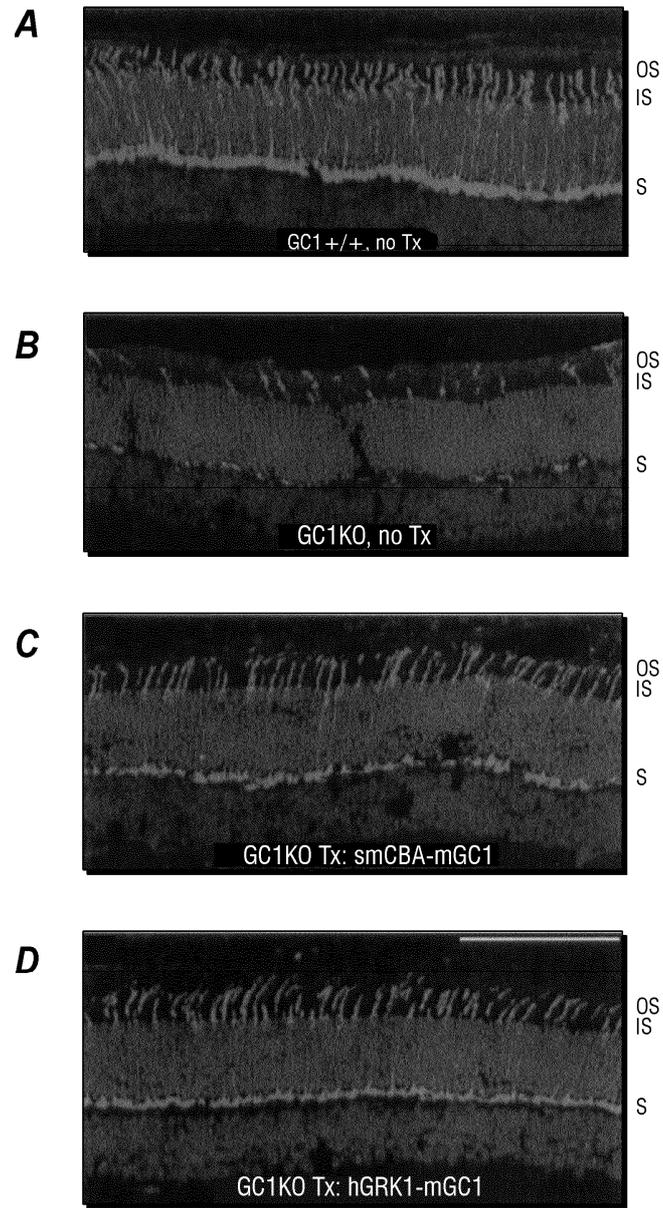
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5

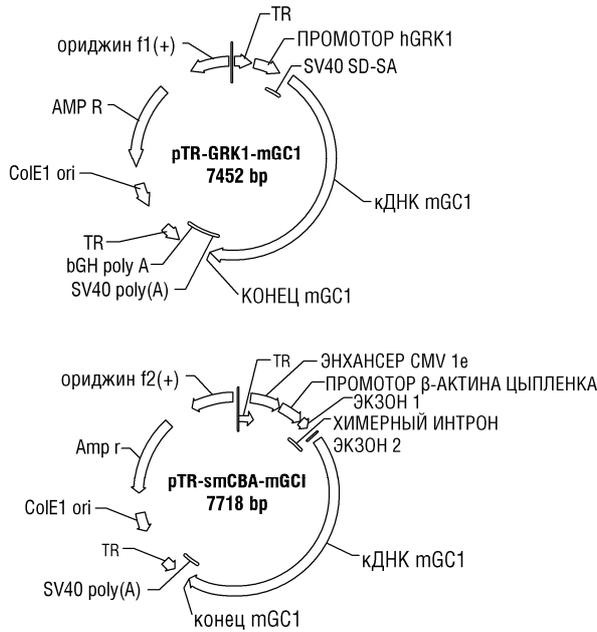




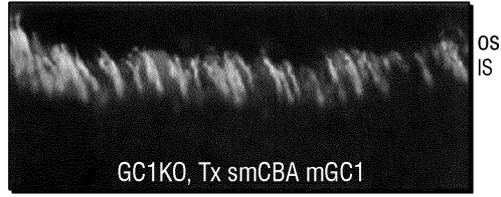
ТРАНСЛЯЦИЯ БЫЧЬЕЙ GC1:  
ТРАНСЛЯЦИЯ кДНК MGC1:  
КОНСЕНСУС:

(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	122
(1)	TR	CTFTL	AGGLRDP	ILGQ	QPT	IRWAF	SP	PGLP	PT	PP	PR	LR	RR
(1)	MS	WLL	AGGL	PG	AG	FC	VP	AP	SP	ES	-	SFS	Y
(1)	MSA	AGGL	G C P R	APS	I	PR	L	LLLLLS	S	LSAVF	VGV	LG	PW
(124)	124	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	245
(124)	TR	V	S	G	L	V	G	P	V	N	P	A	C
(122)	SR	V	S	G	L	V	G	P	V	N	P	A	C
(124)	SR	V	S	G	L	V	G	P	V	N	P	A	C
(244)	244	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	365
(244)	VR	V	M	V	M	H	S	V	L	L	G	G	E
(242)	VR	V	M	V	M	H	S	V	L	L	G	G	E
(244)	VR	V	M	V	M	H	S	V	L	L	G	G	E
(367)	367	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	488	
(367)	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	
(365)	KR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	
(367)	RAR	A	G	G	G	W	S	G	A	V	A	R	
(486)	486	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	607	
(486)	AF	L	A	H	Y	C	R	H	R	L	L	I	
(484)	AF	L	A	H	Y	C	R	H	R	L	L	I	
(486)	AF	L	A	H	Y	C	R	H	R	L	L	I	
(606)	606	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	727	
(606)	AG	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	
(604)	AG	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	
(606)	AG	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	
(727)	727	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	848	
(727)	RG	T	L	A	G	D	V	F	S	L	A	I	
(725)	RG	T	L	A	G	D	V	F	S	L	A	I	
(727)	RG	T	L	A	G	D	V	F	S	L	A	I	
(848)	848	860	880	890	900	910	920	930	940	950	969		
(848)	E	K	Q	K	T	D	R	L	L	T	Q	M	
(846)	E	K	Q	K	T	D	R	L	L	T	Q	M	
(848)	E	K	Q	K	T	D	R	L	L	T	Q	M	
(968)	968	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1089	
(968)	FR	M	R	H	M	E	V	P	V	R	I	R	
(966)	FR	M	R	H	M	E	V	P	V	R	I	R	
(968)	FR	M	R	H	M	E	V	P	V	R	I	R	
(1084)	1084	1090	1100	1110									
(1084)	H	G	I	S	L	E	I	P	P	D	R	R	
(1082)	H	G	I	S	L	E	I	P	P	D	R	R	
(1084)	H	G	I	S	L	E	I	P	P	D	R	R	

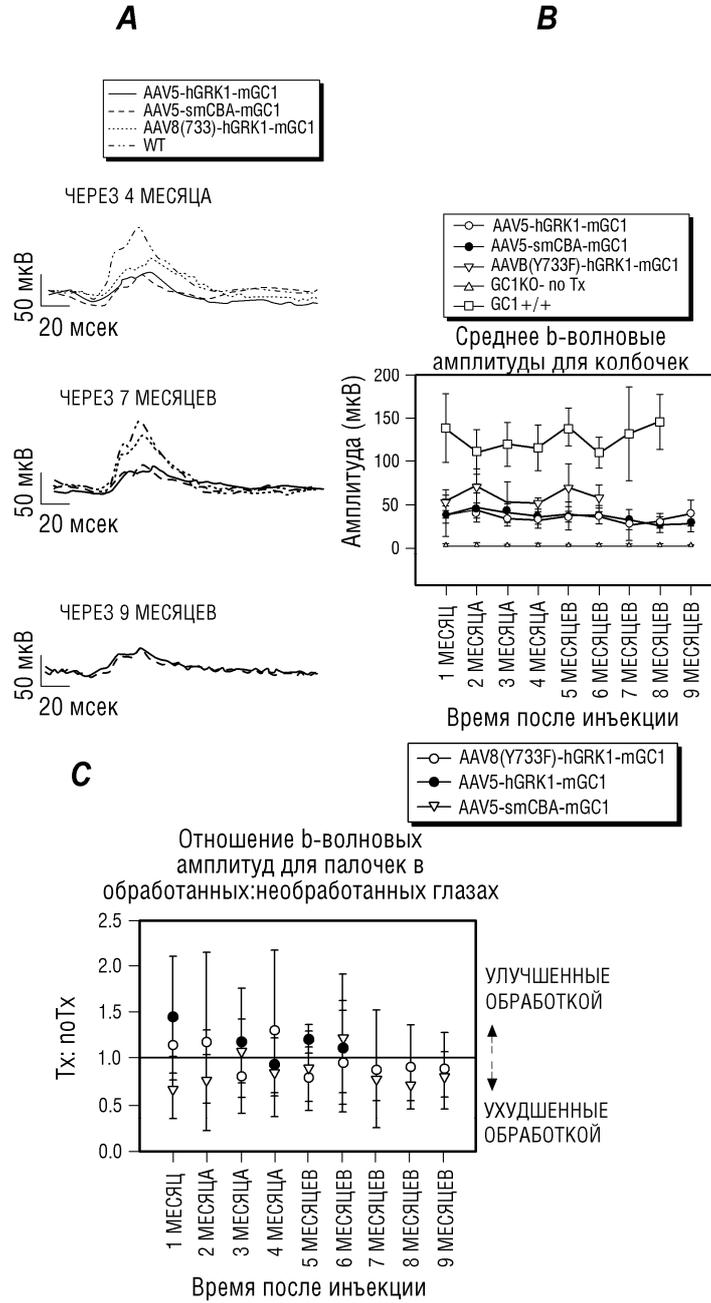
Фиг. 10



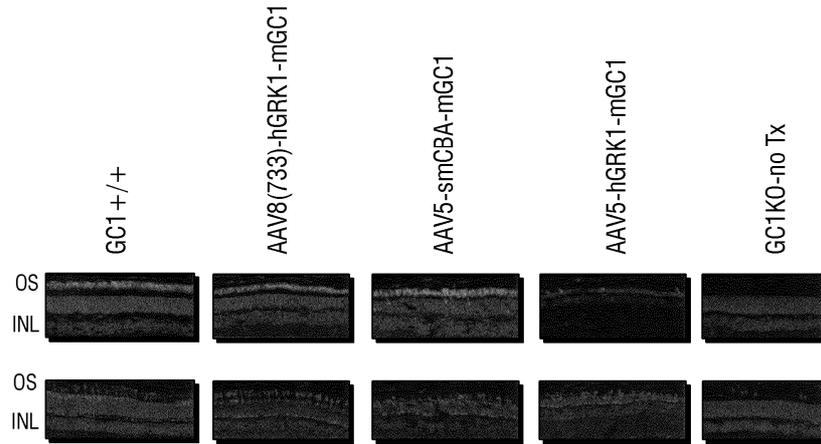
Фиг. 11



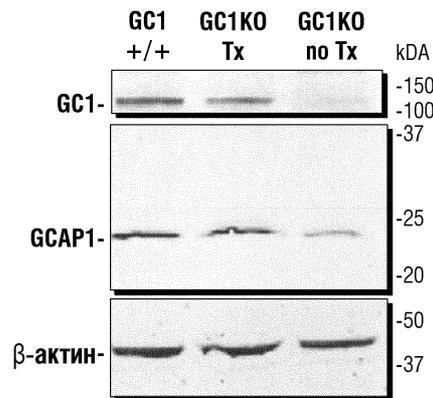
Фиг. 12



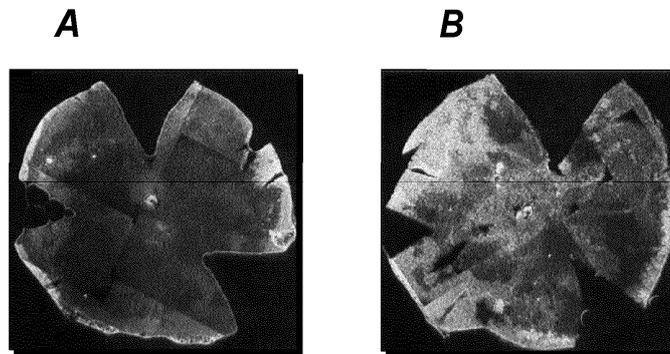
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВЕКТОРА gAAV ПУТЕМ РСР В ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ МЫШЕЙ GC1KO												
	M1a	M2b	M3b	M4c	M5c	M6c	M7c	M8c	M9b	M10c	M11b	M12c
	AAV8(733)-hGRK1	AAV8(733)-hGRK1	AAV5-smCBA	AAV5-smCBA	AAV5-smCBA	AAV5-smCBA	AAV5-smCBA	AAV5-smCBA	AAV5-hGRK1	AAV5-hGRK1	no Tx	no Tx
ЗРИТЕЛЬНЫЙ НЕРВ R	na	na	+160	+1000	+970	+1890	NA	+395	+3140	+1695	-	-
ЗРИТЕЛЬНЫЙ НЕРВ L-632	+25,885	-	na	na	na	na	na	-	-	na	na	na
МОЗГ R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МОЗГ L	-	-	-	-	-	-	-	-	+252	-	-	-

M = ЖИВОТНОЕ; R = ПРАВЫЙ; L = ЛЕВЫЙ; TX = ОБРАБОТКА; - = ОТСУТСТВИЕ РСР-АМПЛИФИКАЦИИ; + = РСР-АМПЛИФИКАЦИЯ ВЕКТОРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (ПОКАЗАН СРЕДНИЙ ОБЪЕМ РЕПЛИКАЦИИ), ЧИСЛО КОПИЙ НА МГ ДНК; NA = НЕ ОПРЕДЕЛЯЛОСЬ (НЕ ОПРЕДЕЛЯЛОСЬ ИЗ-ЗА НЕОЖИДАННОГО СКАЧКА)

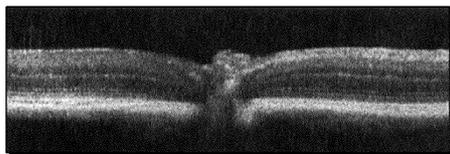
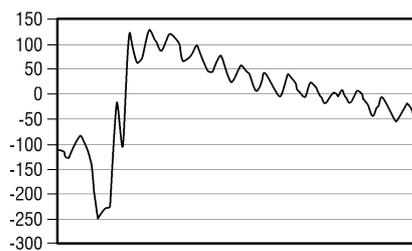
A. = 4 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ

B. = 7 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ

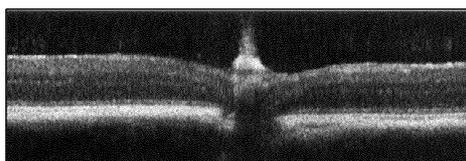
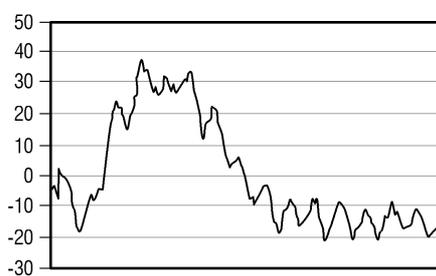
C. = 10 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ

Фиг. 17

035893

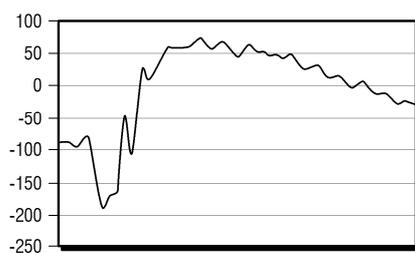


Фиг. 18А



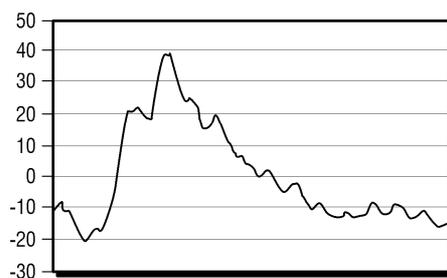
Фиг. 18В

**ОБРАБОТАННЫЕ ПАЛОЧКИ:**

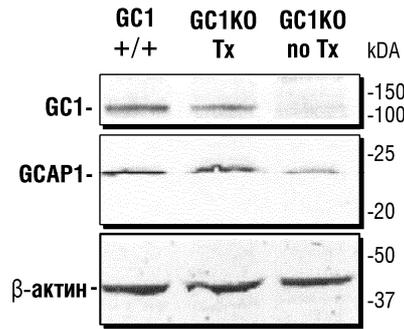


Фиг. 19А

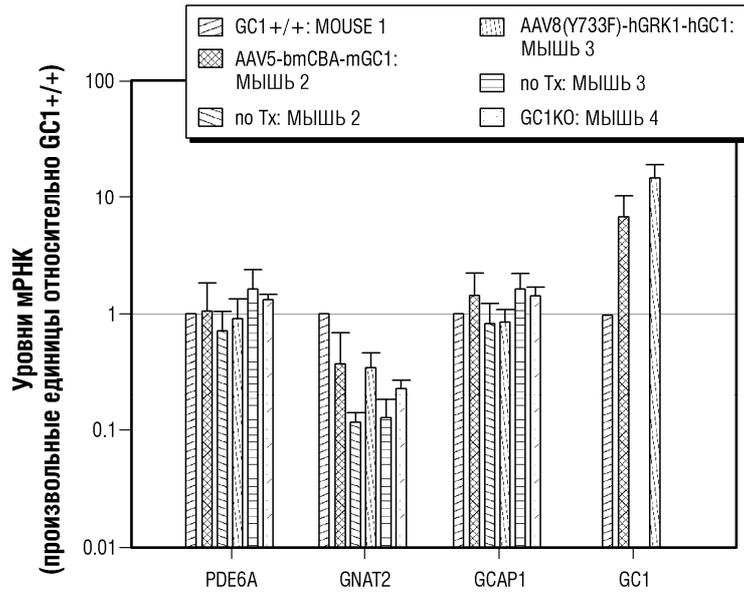
**ОБРАБОТАННЫЕ КОЛБОЧКИ:**



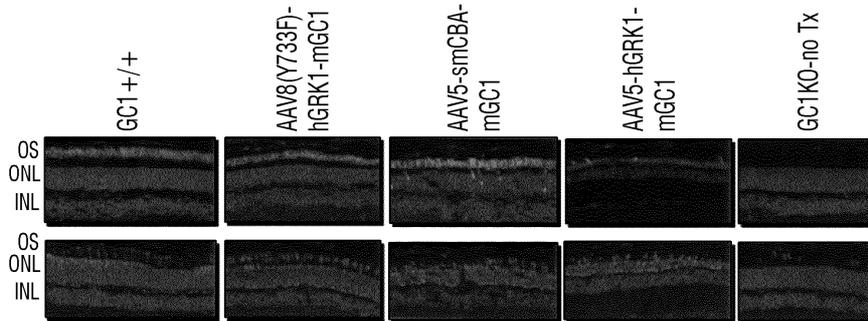
Фиг. 19В



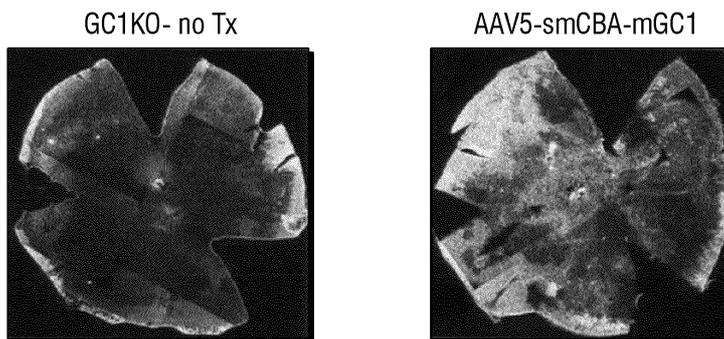
Фиг. 20А



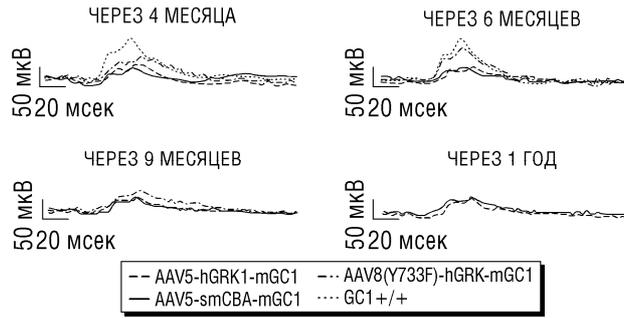
Фиг. 20В



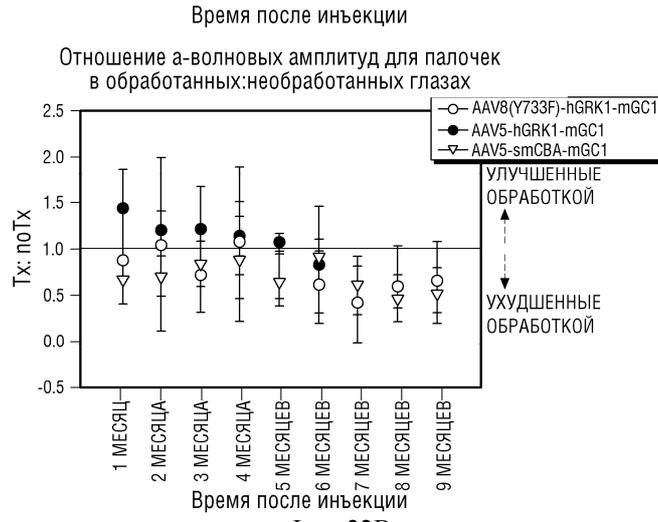
Фиг. 21А



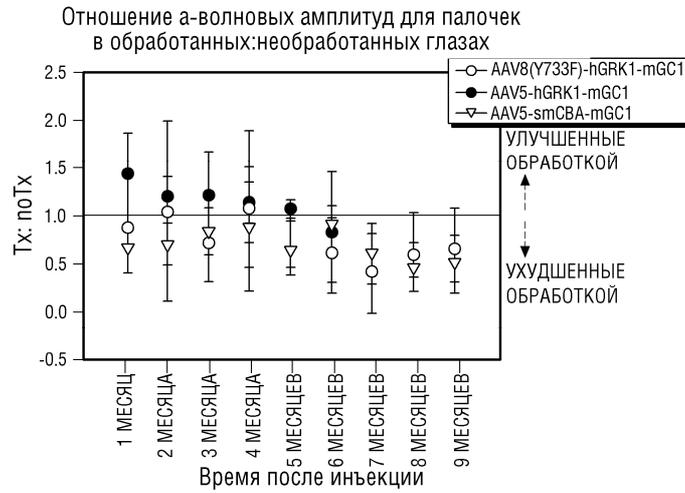
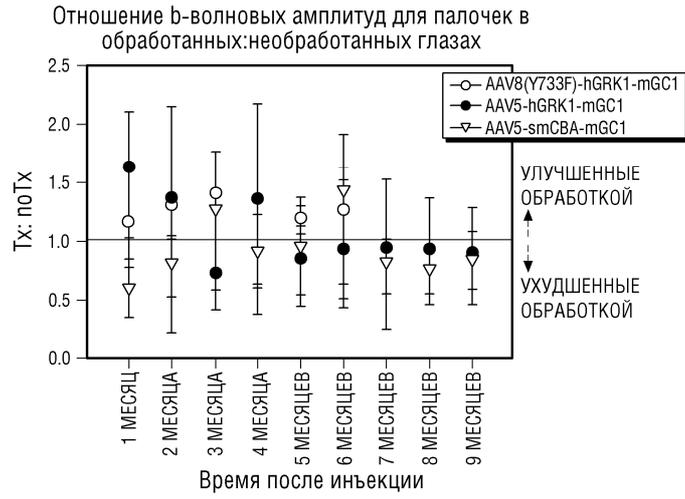
Фиг. 21В



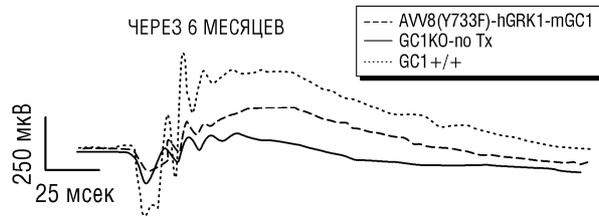
Фиг. 22А



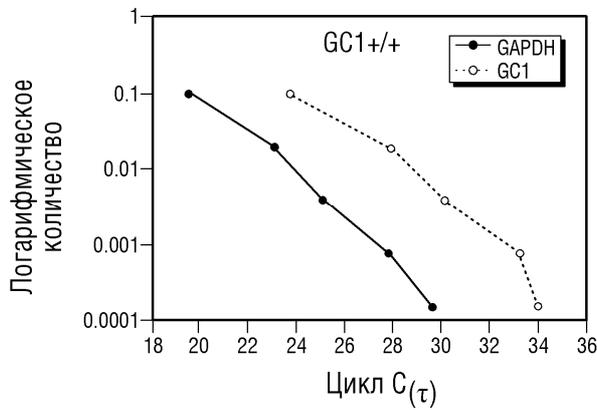
Фиг. 22В



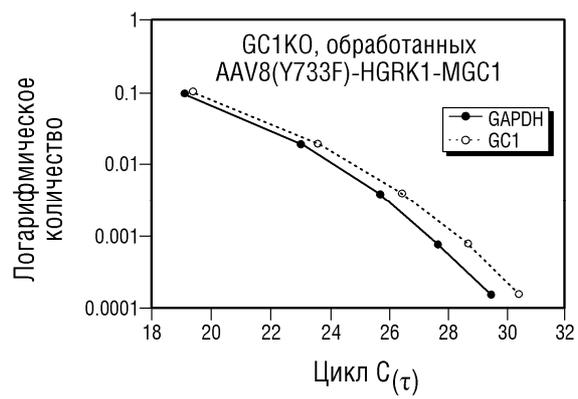
Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 24А



Фиг. 24В

