

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091655** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.11.20

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 15/864* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.01.14

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ СЕТЧАТКИ**

---

(31) 1800546.2

(72) Изобретатель:

(32) 2018.01.12

Али Робин, Мацуки Такааки, Смит  
Александр, Георгиадис Анастасиос  
(GB)

(33) GB

(86) PCT/GB2019/050092

(87) WO 2019/138250 2019.07.18

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ЮСЛ БИЗНЕС ЛТД (GB)

Хмара М.В. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к предупреждению и/или лечению нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, колбочко-палочковые дистрофии, в частности ахроматопсия.

**202091655**  
**A1**

**202091655**

**A1**

## КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ СЕТЧАТКИ

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к терапии для лечения и/или предупреждения  
5 нарушений сетчатки, в частности, колбочковых дистрофий, колбочко-палочковых  
дистрофии и ахроматопсии.

### Предшествующий уровень техники

У многих видов млекопитающих, включая мышей и человека, число палочковых  
10 фоторецепторов, которые опосредуют зрение при тусклом свете, значительно  
превосходит число колбочковых фоторецепторов. Однако, в промышленно развитом  
мире, в котором освещение делает возможным функционирование колбочек на  
протяжении дня и ночи, зрение, опосредованное палочками, является менее важным.  
Многих пациентов с отсутствием функции палочек с рождения идентифицируют только  
15 случайно, и, фактически, они не могут распознать свое нарушенное зрение. Напротив,  
когда имеет место дисфункция колбочек, пациенты всегда имеют симптомы и часто  
страдают дефектом зрения, который зависит от степени их дисфункции колбочек.

При некоторых состояниях, только или главным образом колбочки утрачены или не  
функционируют нормально, а палочки остаются относительно сохранными. Такие  
20 состояния могут быть известны как колбочковые дистрофии или колбочко-палочковые  
дистрофии (CRD – от англ. cone-rod dystrophy). Колбочковые или колбочко-палочковые  
дистрофии представляют собой наследственные дистрофии сетчатки,  
характеризующиеся начальной потерей колбочек или иногда одновременной потерей как  
палочек, так и колбочек. Симптомы включают потерю зрения, чувствительности к яркому  
25 свету и плохое цветное зрение. Например, ахроматопсия представляет собой тяжелую,  
наследственную дистрофию сетчатки с полным отсутствием функции колбочек с  
рождения, но, предположительно, с нормальной функцией палочек. Мутации во  
множестве генов, включая *CNGA3*, *CNGB3* и *PDE6C*, ассоциированы с данным  
заболеванием. Каждый из генов, вызывающих данное заболевание, кодирует важнейший  
30 компонент каскада фототрансдукции в колбочках, который преобразовывает свет в  
электрический сигнал посредством гиперполяризации фоторецепторной клетки.  
Недостаток, например, в белке *CNGA3* или *CNGB3* в колбочковых фоторецепторных  
клетках приводит к неспособности данных клеток к гиперполяризации в ответ на свет. В  
результате, клетки вначале выживают, но не функционируют, а пациент страдает от  
35 плохой остроты зрения, отсутствия цветного зрения и светобоязни с рождения. Разные  
группы разработали протоколы терапии на мышах, дефицитных по *CNGA3*, которые  
улучшают выживаемость и функцию колбочек, а также зрение.

Другие примеры причинных генов, участвующих в патогенезе колбочковых дистрофий, включают *KCNV2*, *PDE6H*, *GNAT2* и *CACNA2D4*. Ген *KCNV2* кодирует белок - член 2 подсемейства V модификаторов калиевых потенциалзависимых каналов. Мутации в *KCNV2* ассоциированы с колбочковой дистрофией со сверхнормальной палочковой электроретинограммой (ERG – от англ. electroretinogram) или колбочковой дистрофией сетчатки типа 3B, аутосомно-рецессивным расстройством, которое вызывает пожизненную потерю зрения в сочетании с сверхнормальным ERG ответом на яркую вспышку света. Ген *PDE6H* кодирует ингибиторную (гамма) субъединицу специфичной в отношении колбочки цГМФ (циклический гуанозинмонофосфат) фосфодиастеразы. Мутации в данном гене ассоциированы с колбочковой дистрофией сетчатки типа 3A (RCD3A). Ген *GNAT2* кодирует специфичную в отношении колбочки альфа субъединицу трансдуцина. Мутации в гене могут приводить к младенческой форме колбочковой дистрофии. Ген *CACNA2D4* кодирует кальциевый канал, потенциалзависимый, альфа-2/дельта субъединицу 4. Мутации в данном гене могут вызывать непрогрессирующую колбочковую дисфункцию (колбочковая дистрофия сетчатки 4, RCD4).

При возрастной макулярной дегенерации (AMD – от англ. age-related macular degeneration) нарушение зрения главным образом вызвано дегенерацией центральной ямки, богатой колбочками, в центральной макуле. Таким образом, пациенты теряют центральное зрение и остроту, но часто имеют относительно хорошо сохранившуюся периферическую макулу и, таким образом, имеют на некотором уровне полезное остаточное зрение, которое ограничено недостатком колбочек снаружи от центральной ямки.

Существует необходимость в разработке терапий, которые могут улучшать выживаемость и функцию колбочек для лечения или предупреждения нарушений сетчатки, таких как колбочко-палочковые дистрофии.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Согласно изобретению предложены нуклеиновые кислоты, единицы контроля транскрипции (TCU – от англ. transcriptional control unit), оптимизированные последовательности генов, экспрессионные конструкции и векторы для экспрессии генов в колбочковых фоторецепторах.

TCU, раскрытые в данном документе, содержат M-опсиновый промотор или его фрагмент под контролем M/L-опсиновой локус-контролирующей области (LCR – от англ. locus control region) и являются полезными для управления высокими уровнями экспрессии во всех трех типах колбочек человека.

Также предложены экспрессионные конструкции, содержащие человеческий ген *CNGA3* под контролем TCU, оптимизированные для экспрессии генов в колбочковых

фоторецепторах, где TCU содержит M-опсиновый промотор или его фрагмент под контролем M/L-опсиновой локус-контролирующей области.

В некоторых воплощениях TCU и экспрессионные конструкции содержат мутацию 6 п.н. (пар нуклеотидов) сразу после сайта инициации транскрипции в M-опсиновом промоторе или его фрагменте (мутация «M8»), где данная мутация может увеличивать эффект лечения от векторов и экспрессионных конструкций, содержащих данную мутацию, с течением времени.

Кроме того, предложена последовательность гена CNGA3 с оптимизацией кодонов, которая предложена в виде SEQ ID NO: 8.

Также предложены векторы, такие как вирусные векторы, содержащие экспрессионные конструкции, раскрытые в данном документе. Экспрессионная конструкция предпочтительно доставляется с использованием вектора, происходящего из 8-го серотипа аденовируса 8 (AAV8) или альтернативного сильного серотипа AAV.

Согласно изобретению также предложены способы использования нуклеиновых кислот, единиц контроля транскрипции (TCU), оптимизированных последовательностей генов, экспрессионных конструкций и векторов для лечения и/или предупреждения нарушений или дистрофий сетчатки, включая колбочковые дистрофии, такие как ахроматоПСия, но, не ограничиваясь ими.

Соответственно, в одном аспекте изобретения предложена:

единица контроля транскрипции (TCU) длиной до 2500 нуклеотидов, содержащая в направлении от 5' к 3':

(a) локус-контролирующую область (LCR), содержащую:

(i) SEQ ID NO 1; или

(ii) последовательность, обладающую по меньшей мере 90%-ой идентичностью

последовательностей с указанной последовательностью (a) (i); и

(b) промоторный элемент, содержащий:

(i) по меньшей мере 200 нуклеотидов или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 17; или

(ii) последовательность, обладающую по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с указанной последовательностью (b)(i);

причем указанная TCU демонстрирует активность промотора, специфичную в отношении колбочкового фоторецептора.

Согласно указанному выше аспекту, промоторный элемент (b) может, возможно, содержать по меньшей мере последние 200 или последние 500 нуклеотидов либо SEQ ID NO: 2, либо SEQ ID NO: 17, или последовательности, обладающей по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с последними 200 или последними 500 нуклеотидами или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 17.

Согласно любому из указанных выше аспектов, промоторный элемент (b) может содержать по меньшей мере 200 нуклеотидов SEQ ID NO: 3, возможно где промоторный

элемент (b) также содержит последовательность по меньшей мере из 10 смежных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидов 1 - 35 SEQ ID NO: 3, или последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, выбранную из последовательности, обладающей по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с нуклеотидами 1 - 35 SEQ ID NO: 3.

Согласно любому из указанных выше аспектов, промоторный элемент (b) может содержать SEQ ID NO: 3 [промоторный элемент, размером 529 п.н., в hG1.7] или SEQ ID NO: 5 [промоторный элемент, размером 247 п.н., в hG1.4] или последовательность, обладающую по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В любом из указанных выше аспектов промоторный элемент может дополнительно содержать SEQ ID NO: 16 [мутация M8]. Например, согласно любому из указанных выше аспектов, нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1934 - 1939 (GGGCCG) SEQ ID NO: 2, могут быть заменены SEQ ID NO: 16.

Согласно одному аспекту TCU содержит SEQ ID NO: 4 [вариант промоторной конструкции hG1.7, отсутствует четыре нуклеотида], SEQ ID NO: 6 [конструкция hG1.4] или SEQ ID NO: 15 [промоторная конструкция hG1.7 в продукте].

Согласно изобретению также предложена экспрессионная конструкция, содержащая TCU, описанную в данном документе, где TCU функционально связана с последовательностью, подлежащей экспрессии специфичным в отношении колбочкового фоторецептора образом. В одном воплощении последовательность, функционально связанная с TCU, содержит ген, кодирующий CNGA3, CNGB3, PDE6C, PDE6H, GNAT2, KCNV2 или CACNA2D4. В некоторых воплощениях функционально связанная последовательность содержит SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14, или обладает по меньшей мере 80%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 и обладает способностью восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора. В одном воплощении функционально связанная последовательность содержит SEQ ID NO: 8 [CNGA3 последовательность с оптимизацией кодонов], или последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 8 и обладает способностью восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора.

Согласно изобретению также предложены векторы, содержащие любую из нуклеиновых кислот, TCU, фрагменты промоторов, гены с оптимизированными кодонами и/или экспрессионные конструкции, описанные в данном документе. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вирусный вектор.

В некоторых воплощениях вектор представляет собой вектор AAV и/или содержит геном AAV или его производное. В одном воплощении производное представляет собой химерное, «перетасованное» производное или производное с модифицированным

капсидом. В одном воплощении геном AAV происходит из серотипа или изолята или клады AAV естественного происхождения. В одном воплощении геном AAV происходит из серотипа 2 AAV (AAV2), серотипа 4 AAV (AAV4) или серотипа 8 AAV (AAV8), и/или капсид AAV происходит из AAV8. В предпочтительном воплощении геном происходит из AAV2, и капсид происходит из AAV8. В одном воплощении вектор AAV несет ген, кодирующий CNGA3.

Согласно изобретению дополнительно предложены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту или вектор, раскрытый в данном документе, а также клетки-хозяева, которые продуцируют нуклеиновую кислоту или вирусный вектор, как раскрыто в данном документе. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293 или HEK293T.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно изобретению дополнительно предложены способы использования нуклеиновых кислот, векторов, оптимизированных последовательностей генов и/или экспрессионных конструкций, описанных в данном документе, в способе предупреждения или лечения нарушений сетчатки. В одном воплощении нуклеиновые кислоты, векторы, оптимизированные последовательности генов и/или экспрессионные конструкции, описанные в данном документе, используют в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения нарушений сетчатки. Также предложен способ лечения или предупреждения нарушений сетчатки у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества вектора, раскрытого в данном документе. В одном воплощении нарушение сетчатки представляет собой ахроматопию. В некоторых воплощениях вектор вводят пациенту посредством инъекции прямо в сетчатку, субретинальной или интравитреальной инъекции.

### Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 показаны результаты исследования экспрессии репортерного гена *in vivo* у трансгенных мышей для оценки эффекта положения локус-контролирующей области (LCR) на коровый промотор зеленого (M) опсина. Слева вверху: Ряд нормальных генов красных и зеленых пигментов человека, показывающий положения LCR, транскрипционных единиц и экзонов. Слева внизу: Ряды модифицированных генов зрительных пигментов, показанные в масштабе, увеличенном в 10 раз. Сайты инициации и направление транскрипции показаны стрелками. P<sub>красный</sub> представляет собой промотор гена красного пигмента человека. P<sub>зеленый</sub> представляет собой промотор гена зеленого пигмента человека. AP (от англ. alkaline phosphatase), человеческая плацентарная щелочная фосфатаза. lacZ, β-галактозидаза *E. coli*. Справа:

секторные диаграммы, демонстрирующие долю клеток, экспрессирующих трансген, которые экспрессируют только AP (красный), только lacZ (темно-зеленый), и AP и lacZ (желтый) или lacZ>>AP (светло-зеленый) у химерных мышей или мышей с передачей зародышевой линии для конструкций, показанных слева. Число клеток от разных мышей, происходящих из одной и той же линии клеток ES, объединяли в пул с получением одной единственной секторной диаграммы. Число клеток для тех мышинных линий, из которых маркер PGK-нео удаляли посредством скрещивания с мышами зародышевой линии *cre*, показано сразу справа от секторной диаграммы для соответствующей родительской линии.

На Фиг. 2 показана схематическое изображение хромосомной перестройки промоторов красного (L-) и зеленого (M-) опсина (в рамочке, сверху). Схематические изображения ранее разработанных транскрипционных единиц (pR2.1 и PR1.7), а также сконструированных единиц контроля транскрипции, раскрытых в данном исследовании. LCR представляет собой локус-контролирующую область.

На Фиг. 3 проиллюстрирован профиль трансдукции колбочковых клеток, трансдуцированных вектором AAVssh10, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP – от англ. green fluorescent protein) под контролем TCU hG1.4. Показаны криосрезы человеческой сетчатки, происходящей из эмбриональной стволовой клетки, трансдуцированной AAVshh10-hG1.4(M8)-GFP. Профиль трансдукции колбочковых клеток визуализировали посредством GFP-визуализации (A). Совместная локализация синего опсина (S-опсин; B) с GFP (B') и красного/зеленого опсина (L/M-опсин; C) с GFP (C') показана после окрашивания с использованием антител, которые связываются либо с синим опсином (S-опсин), либо с красным/зеленым опсинами (L/M опсин).

На Фиг. 4 проиллюстрировано, что включение последовательности M8 в TCU усиливает восстановление фотопических ответов у мышей, нокаутированных по *CNGA3*. Показаны фотопические ответы электроретинограммы (ERG – от англ. electroretinogram) мышей, нокаутированных по *Cnga3*, обработанных векторами AAV2/8, несущими конструкции CNGA3 (соCNGA3) с оптимизацией кодонов, управляемые разными TCU с или без последовательности M8. Показаны ERG ответы по итогам 1 месяца (левые столбцы) и 2 месяцев (правые столбцы) после инъекции. Всех животных обрабатывали в возрасте 1 месяца, за исключением крайней правой группы; данную группу обрабатывали в 2 недели.

На Фиг. 5 проиллюстрировано, что CNGA3 с оптимизированными кодоном восстанавливает фотопические ответы у мышей, нокаутированных по *CNGA3*, более эффективно, чем ген *CNGA3* дикого типа. Фотопические ERG ответы у мышей, нокаутированных по *Cnga3*, обработанных векторами AAV2/8, несущими конструкции CNGA3 («со») с оптимизацией кодонов и CNGA3 дикого типа («non-so»).

Фиг. 6 иллюстрирует, что вектор AAV2/8, экспрессирующий CNGA3 под контролем TCU hG1.4, является эффективным в восстановлении функции колбочек у мышей, нокаутированных по *CNGA3*. (А) Фотопические ERG следы AAV8-обработанной и необработанной мыши, нокаутированной по *Cnga3*. Аннотированы А- и В-волны. Y-ось обозначает мкВ. Установки яркости света: 10 кд/м<sup>2</sup>. (В) Фотопические ERG ответы мышей, нокаутированных по *Cnga3*, обработанных или AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3, или AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3. Установки яркости света: 10 кд/м<sup>2</sup>.

Фиг. 7 иллюстрирует длительное восстановление *in vivo* чувствительности сетчатки посредством векторов AAV2/8, экспрессирующих CNGA3 под контролем двух разных оптимизированных TCU вплоть до 6 месяцев после обработки. *Cnga3*-дефицитным мышам в возрасте 2 недель субретинально инъецировали или AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n равен 14), или AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n равен 13) (титр  $1 \times 10^{12}$  вг/мл в обоих случаях). Необработанные (n равен 3). Установки яркости света: 10 кд/м<sup>2</sup>.

Фиг. 8 иллюстрирует повышенную выживаемость колбочек *in vivo* через 3-4 месяца после обработки векторами AAV2/8, экспрессирующими CNGA3 под контролем TCU hG1.7. Сделанные в одной плоскости конфокальные изображения сетчатки плоского препарата от мыши C57BL/6J возраста 3-4 месяца (А), или *Cnga3*-дефицитной мыши того же возраста, которой не инъецировали (В) или инъецировали (С) AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 в возрасте 2 недели. Сетчатки окрашивали колбочковым аррестином и освещали. Масштабная линейка: 5 мкм.

Фиг. 9 иллюстрирует длительную повышенную выживаемость колбочек *in vivo* через 13 месяцев после обработки вектором AAV2/8, экспрессирующим CNGA3 под контролем TCU hG1.7. Конфокальные изображения в Z-проекции (А, В) или конфокальные изображения в одной плоскости (С, D) сетчатки плоского препарата от *Cnga3*-дефицитной мыши в возрасте 14 месяцев, которой инъецировали AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 в возрасте 2 недели. Необработанная мышь не демонстрирует позитивного PNA-окрашивания в данном возрасте. Плоские препараты сетчатки окрашивали PNA (А, С) и колбочковым аррестином (В, D) и освещали. Масштабная линейка: 10 мкм (А, В), 5 мкм (С, D).

Фиг. 10 иллюстрирует количественную оценку улучшения синаптической целостности между колбочковыми клетками и поддержания нейронов (биполярные клетки) *in vivo* через 3-4 месяца после обработки вектором AAV2/8, экспрессирующим CNGA3 под контролем TCU hG1.7. Оценку осуществляли, используя интенсивность сигнала маркера синапса Gpr179. Анализ интенсивности сигнала Gpr179 окрашивания проводили на сделанных в одной плоскости конфокальных изображениях плоских препаратов сетчатки от мыши C57BL/6J возраста 3-4 месяца или *Cnga3*-дефицитной мыши того же возраста, которой не инъецировали или инъецировали AAV2/8-

hG1.7(M8).coCNGA3 в возрасте 2 недели. Сетчатки окрашивали Gpr179 и PNA и затем освещали. Gpr179-окрашивания отслеживали посредством черчения линии от руки при нескольких Gpr179-окрашиваниях, связанных с «ножкой» колбочки (PNA-окрашивание использовали для подтверждения «ножек» колбочек), и более чем 10 Gpr179-окрашиваниях, связанных со сферулой палочки (A). Интенсивность сигнала была результатом вычислений (B; белая линия: Gpr179, красная линия: PNA). Пики интенсивности сигнала от каждого источника усредняли, и рассчитывали отношение GPr179-окрашиваний, связанных с «ножками» колбочек, к GPr179-окрашиваниям, связанным со сферулами палочек (CP/RS). CP/RS от четырех разных положений использовали для статистического анализа (критерий множественного сравнения Бонферрони (ns (от англ. not significant – незначимый)): p больше 0,05, \*\*: p меньше или равный 0,01, \*: p меньше или равный 0,05)). Планка погрешностей показывает SEM (от англ. Standard Error of the Mean - Стандартная ошибка среднего). (C).

Фиг. 11 иллюстрирует, что экспрессия CNGA3 под контролем TCU hG1.4 в векторах AAV8 приводит к улучшенным ERG ответам у CNGA3-дефицитных мышей, по сравнению с векторами AAV Anc80L65, AAV44.9 или AAV5, соответственно. (A). Сравнение Anc80L65 и AAV8. AAV-Anc80L65 или AAV8, несущие экспрессионную кассету hG1.4(M8).coCNGA3, доставляли *Cnga3*-дефицитным мышам в возрасте 2-х недель. \*\*: p меньше или равный 0,01, \*: p меньше или равный 0,05. Планка погрешностей показывает SEM. (B). Сравнение AAV8 и AAV44.9 для доставки CNGA3 в *Cnga3*-дефицитных мышах в возрасте 4 недели. Планка погрешностей показывает SEM. (C) Сравнение AAV5 и AAV8. AAV5 или AAV8, несущие экспрессионную кассету hG1.4(M8).coCNGA3, доставляли *Cnga3*-дефицитным мышам в возрасте 2-х недель. \*\*: p меньше или равный 0,01, \*: p меньше или равный 0,05. Планка погрешностей показывает SEM.

Фиг. 12 иллюстрирует улучшенные уровни экспрессии TCU hG1.4 и hG1.7, несущих мутацию M8, по сравнению с уровнями экспрессии, наблюдаемыми для известных колбочковых промоторов. (A) hEB в возрасте 17-19 недель трансдуцировали AAVShH10, экспрессирующим eGFP под двумя разными промоторами зеленого опсина (hG1.4 и hG1.7) и собирали, спустя 2 недели (n равен 6-8 для каждого промотора). После диссоциации клетки анализировали в отношении относительной средней интенсивности флуоресценции (MFI – от англ. median fluorescence intensity) в GFP-позитивных клетках (относительную MFI в hEB, трансдуцированных AAVShH10-eGFP, анализируемую в тот же день эксперимента, рассчитывали в виде отношения к MFI в EB, трансдуцированных AAV ShH10-1.7L-eGFP) посредством проточной цитометрии. Звездочка показывает значимое различие (p меньше или равен 0,01). Планка погрешностей показывает SEM. (B) фотопические ERG ответы обработанных мышей, нокаутированных по *Cnga3*, обработанных или AAV2/8-CAR-CNGA3, или оставшихся необработанными. Y-ось обозначает мкВ. Установки яркости света: 10 кд/м<sup>2</sup>.

### Краткое описание последовательностей

5 SEQ ID NO: 1 показывает ДНК-последовательность фрагмента локус-контролирующей области M/L опсина человека размером 1,2 т.п.н. (тысяча пар нуклеотидов)

SEQ ID NO: 2 показывает ДНК-последовательность фрагмента M опсинового промотора человека размером 2,0 т.п.н.

SEQ ID NO: 3 показывает ДНК-последовательность фрагмента M опсинового промотора человека размером 500 п.н.

10 SEQ ID NO: 4 показывает ДНК-последовательность варианта конструкции hG1.7(M8), которая состоит из фрагмента локус-контролирующей области M/L опсина человека размером 1,2 т.п.н., за которым следует фрагмент M опсинового промотора человека размером 500 п.н., причем указанный фрагмент опсинового промотора включает мутацию M8.

15 SEQ ID NO: 5 показывает ДНК-последовательность фрагмента M опсинового промотора человека размером 200 п.н.

20 SEQ ID NO: 6 показывает кДНК-последовательность конструкции hG1.4(M8), которая состоит из фрагмента локус-контролирующей области M/L опсина человека размером 1,2 т.п.н., за которым следует фрагмент M опсинового промотора человека размером 200 п.н, причем указанный фрагмент опсинового промотора включает мутацию M8.

SEQ ID NO: 7 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *CNGA3*.

SEQ ID NO: 8 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *CNGA3* с оптимизированными кодонами.

25 SEQ ID NO: 9 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *PDE6C*.

SEQ ID NO: 10 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *PDE6H*.

SEQ ID NO: 11 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *GNAT2*.

SEQ ID NO: 12 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *KCNV2*.

30 SEQ ID NO: 13 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *CACNA2D4*.

SEQ ID NO: 14 показывает кДНК-последовательность человеческого гена *CNGB3*.

35 SEQ ID NO: 15 показывает ДНК-последовательность конструкции hG1.7(M8), которая содержит фрагмент локус-контролирующей области M/L опсина человека размером 1,2 т.п.н., за которым следует последовательность GATC и фрагмент M опсинового промотора человека размером 500 п.н., причем указанный фрагмент опсинового промотора включает мутацию M8.

SEQ ID NO: 16 показывает последовательность мутации M8.

SEQ ID NO: 17 показывает ДНК-последовательность фрагмента М опсинового промотора человека размером 2,0 т.п.н, содержащего мутацию М8.

### **Подробное описание изобретения**

5           Следует понимать, что разные применения раскрытых полинуклеотидных последовательностей могут быть приспособлены для конкретных потребностей в данной области. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предложена только с целью описания конкретных воплощений изобретения и не предназначена для ограничения.

10           Кроме того, как использовано в данном описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения, термины в единственном числе включают ссылки во множественном числе, если контекстом явно не продиктовано иное. Таким образом, например, ссылка на «полинуклеотид» включает «полинуклеотиды», ссылка на «промотор» включает «промоторы», ссылка на «вектор» включает два или более таких  
15 векторов и т.п. «M/L опсин» и «L/M опсин» используются взаимозаменяемо для ссылки на зеленый и красный опсин.

          Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в данном документе, выше или ниже, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

20

### **Единицы контроля транскрипции (TCU)**

          В одном аспекте согласно изобретению предложена TCU, оптимизированная для экспрессии генов в колбочковых фоторецепторных клетках. В одном воплощении согласно раскрытию предложена TCU, которая содержит фрагмент локус-  
25 контролирующей области (LCR) M/L опсина. В предпочтительном воплощении TCU содержит фрагмент локус-контролирующей области (LCR) M/L опсина человека.

          В другом воплощении согласно раскрытию предложена TCU, которая содержит промоторную область, такую как М опсиновый промотор или его фрагмент. В предпочтительном воплощении TCU, раскрытая в данном документе, содержит М  
30 опсиновый промотор человека или его фрагмент.

          В некоторых воплощениях TCU содержит фрагменты и/или варианты локус-контролирующей области (LCR) M/L опсина человека и M-опсиновый промотор человека или его фрагмент, где TCU обладает промоторной активностью, специфичной в отношении колбочкового фоторецептора.

35           В одном воплощении TCU содержит LCR, которая содержит последовательность нуклеотидов, обычно смежных нуклеотидов, из SEQ ID NO: 1, которая обеспечивает специфичную в отношении колбочкового фоторецептора экспрессию функционально связанной полинуклеотидной последовательности. Кроме того, рассматривается LCR,

которая содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-ной или по меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях LCR  
5 содержит делецию или вставку одного или более нуклеотидов, где делеция или вставка не отменяет специфичную в отношении колбочкового фоторецептора экспрессию гена, функционально связанного с модифицированной LCR.

В одном воплощении TCU содержит M опсиновый промотор или его фрагмент, где M опсиновый промотор или его фрагмент содержит последовательность нуклеотидов,  
10 обычно смежных нуклеотидов, из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, которая обеспечивает специфичную в отношении колбочкового фоторецептора экспрессию функционально связанной полинуклеотидной последовательности. M опсиновый промотор или его фрагмент может, например, содержать вплоть до 1200 нуклеотидов SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, и предпочтительно не больше чем 1100, не больше чем 1000, не больше  
15 чем 900, не больше чем 800, не больше чем 700, не больше чем 600, не больше чем 500, не больше чем 400, не больше чем 300 или не больше чем 200 нуклеотидов SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях фрагмент M опсинового промотора содержит по меньшей мере 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17. Кроме того, рассматривается фрагмент M опсинового промотора, обладающий по  
20 меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-ной или по меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400 или по меньшей мере 500 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях M-опсиновый  
25 промотор или его фрагмент содержит делецию или вставку одного или более нуклеотидов, где делеция или вставка не отменяет специфичную в отношении колбочкового фоторецептора экспрессию гена, оперативно связанного с модифицированным M-опсиновым промотором или фрагментом. В некоторых воплощениях M-опсиновый промотор или его фрагмент по существу состоит из SEQ ID  
30 NO: 2 или SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях M-опсиновый промотор или его фрагмент состоит из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17.

Предпочтительно, TCU содержит фрагмент M опсинового промотора, который содержит SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 3. Кроме того, рассматривается TCU, содержащая фрагмент M опсинового  
35 промотора, который содержит по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400 или по меньшей мере 500 нуклеотидов SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-

ной или по меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400 или по меньшей мере 500 нуклеотидами SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях фрагмент М опсинового промотора по существу состоит из SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях фрагмент М опсинового промотора состоит из SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях TCU содержит по меньшей мере 200 нуклеотидов SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с по меньшей мере 200 нуклеотидами SEQ ID NO: 3 и последовательности, содержащей по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 35 смежных нуклеотидов 1-35 SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях TCU содержит по меньшей мере 200 нуклеотидов SEQ ID NO: 3 или последовательности, обладающей по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с по меньшей мере 200 нуклеотидами SEQ ID NO: 3 и последовательности, обладающей по меньшей мере 90%-ной идентичностью последовательностей с по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 35 смежными нуклеотидами, соответствующими нуклеотидам 1-35 SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно, TCU содержит фрагмент М опсинового промотора, который содержит SEQ ID NO: 5 или последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях фрагмент М опсинового промотора по существу состоит из SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях фрагмент М опсинового промотора состоит из SEQ ID NO: 5.

Дополнительные промоторы и их фрагменты, рассматриваемые для применения в TCU, представляют собой промоторы или фрагменты промоторов, которые отличаются в последовательности от последовательностей, приведенных выше, но сохраняют промоторную активность, специфичную в отношении колбчковых фоторецепторов. Такие последовательности обладают по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-ной или по меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с последовательностью смежных нуклеотидов из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, как определено выше. Выраженная в процентах идентичность последовательностей вариантов предпочтительно измеряется по всей длине соответствующей части SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17 или по участку из 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или 1200 нуклеотидов SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, выравненных с вариантом последовательности. Кроме того, рассматриваются промоторы и их фрагменты, которые содержат последовательность, которая обладает по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-ной или по

меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 3 и/или с SEQ ID NO: 5.

Идентичность последовательностей может рассчитываться с использованием любого подходящего алгоритма. Например, алгоритмы PILEUP и BLAST можно использовать для расчета идентичности или выравнивания последовательностей (как например, идентифицируя эквивалентные или соответствующие последовательности (обычно при их установках «по умолчанию»), например, как описано в Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10). Программное обеспечение для выполнения BLAST анализов общедоступно через национальный центр биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данный алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP –от англ. high scoring sequence pair) посредством идентификации коротких слов длины  $W$  в запрашиваемой последовательности, которые или совпадают или соответствуют некоторому положительно оцениваемому пороговому показателю  $T$  при выравнивании со словом такой же длины в последовательности базы данных.  $T$  называется порогом показателя сходства слов (Altschul et al, см. выше). Данные исходные совпадения соседних слов действуют в качестве затравки для инициирования поисков для нахождения HSP, содержащих их. Совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности насколько может быть увеличен совокупный бальный показатель выравнивания. Расширения для совпадений слов в каждом направлении прекращаются, когда: совокупный бальный показатель выравнивания снижается на величину  $X$  от его максимально достигаемого значения; совокупный бальный показатель опускается до нуля или ниже вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательным бальным показателем; или достигается конец каждой последовательности. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLAST использует по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, BLOSUM62 оценочную матрицу (см. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) выравниваний ( $B$ ) 50, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=4$  и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST проводит статистический анализ сходства двух последовательностей; см., например, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Одним количественным показателем сходства, предоставляемым алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), которая обеспечивает показатель вероятности, с которой совпадение двух полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайным образом. Например, последовательность считается похожей на другую последовательность, если наименьшая суммарная вероятность, при сравнении первой последовательности со второй последовательностью, меньше чем примерно 1, предпочтительно меньше чем

примерно 0,1, более предпочтительно меньше чем примерно 0,01, и наиболее предпочтительно меньше чем примерно 0,001. В качестве альтернативы, в пакете UWGCG предложена программа BESTFIT, которую можно использовать для расчета идентичности (например, использовать с ее установками по умолчанию) (Devereux et al  
5 (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

В некоторых воплощениях TCU содержит M-опсиновый промотор или его фрагмент, который содержит мутантную последовательность M8 TCTAGA (SEQ ID NO: 16). В одном воплощении TCU содержит M-опсиновый промотор или его фрагмент, который содержит один, два, три, четыре, пять или шесть нуклеотидов SEQ ID NO: 16.  
10 Например, нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1934 - 1939 (GGGCCG) SEQ ID NO: 2, могут быть заменены SEQ ID NO: 16.

В некоторых воплощениях TCU включает дополнительные нуклеотидные последовательности, не обнаруживаемые в природе в LCR M/L опсина и/или промоторных областях M-опсина. Дополнительные нуклеотидные последовательности  
15 могут подставлять собой 5' или 3' либо LCR либо промоторной области M-опсина. В некоторых воплощениях дополнительная последовательность расположена между LCR и промоторной областью M-опсина. В одном воплощении последовательность «GATC» расположена между областью LCR и M-опсиновой областью.

В одном воплощении TCU содержит SEQ ID NO: 4. В одном воплощении TCU  
20 содержит SEQ ID NO: 6. В одном воплощении TCU содержит SEQ ID NO: 15.

Кроме того, рассматривается TCU, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, по меньшей мере 85%-ной, по меньшей мере 90%-ной, по меньшей мере 95%-ной, по меньшей мере 98%-ной или по меньшей мере 99%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 4,  
25 SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 15.

В одном воплощении TCU по существу состоит из SEQ ID NO: 4. В одном воплощении TCU по существу состоит из SEQ ID NO: 6. В одном воплощении TCU по существу состоит из SEQ ID NO: 15.

В одном воплощении TCU состоит из SEQ ID NO: 4. В одном воплощении TCU  
30 состоит из SEQ ID NO: 6. В одном воплощении TCU состоит из SEQ ID NO: 15.

TCU может дополнительно быть размещена где-либо в пределах большей последовательности, при условии что сохраняется промоторная активность, специфичная в отношении колбочкового фоторецептора. В воплощениях, TCU, описанные в данном документе, расположены ближе к 5' концу или непосредственно 5'  
35 относительно гена, подлежащего экспрессии (например, нагрузки), образом, специфичным в отношении колбочкового фоторецептора, как описано в данном документе.

TCU можно также использовать в тандеме с другими регуляторными элементами, такими как один или более дополнительных промоторов, энхансеров и/или LCR.

TCU может быть предоставлена в виде выделенной молекулы нуклеиновой кислоты.

5 TCU, предложенная данным раскрытием, может быть использована для управления экспрессией генов (нагрузки) в колбачковом фоторецепторе образом, специфичным в отношении колбачкового фоторецептора. Экспрессия, специфичная в отношении колбачкового фоторецептора, может быть определена как экспрессия, которая происходит только в колбачковом фоторецепторе, а в других типах клеток не  
10 значительно. Экспрессия, специфичная в отношении колбачкового фоторецептора, может быть определена как экспрессия, уровень которой более чем примерно в 10 раз выше, 20 раз выше, 50 раз выше или 100 или более раз выше в колбачковом фоторецепторе, чем в других типах клеток, особенно в палочковых фоторецепторных клетках. Экспрессию в колбачковых фоторецепторах и других типах клеток можно измерять любой подходящей  
15 стандартной методикой, известной специалисту в данной области. Например, уровни экспрессии РНК могут быть измерены посредством количественной ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени. Экспрессию белка можно измерять посредством вестерн-блоттинга или иммуногистохимии. TCU, предложенные в данном документе, обеспечивают экспрессию функционально связанного гена во всех подтипах колбачковых  
20 фоторецепторов.

TCU, предложенная данным раскрытием, может быть использована для управления значимо повышенной экспрессией генов в колбачковом фоторецепторе, по сравнению с референсной TCU или промотором. Значимо повышенная экспрессия может быть определена как экспрессия гена в колбачковом фоторецепторе, повышенная более  
25 чем в примерно 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз или 300 раз, по сравнению с экспрессией, управляемой референсной TCU или промотором, включая исходный M-опсиновый промотор, но, не ограничиваясь им. Экспрессию в колбачковых фоторецепторах и других типах клеток можно измерять любой подходящей стандартной методикой, известной специалисту в данной области. Например, уровни экспрессии ДНК  
30 можно измерять посредством количественной ПЦР в реальном времени. Экспрессия белка может быть измерена посредством вестерн-блоттинга или иммуногистохимии.

TCU, предложенная данным раскрытием, может использоваться для управления экспрессией белок-кодирующей нуклеотидной последовательности в колбачковом фоторецепторе, включая нуклеотидные последовательности, экспрессирующие белки,  
35 которые в обычных условиях не экспрессируются в колбачковом фоторецепторе, как например, GFP.

Например, TCU, предложенные в данном раскрытии, полезны для экспрессии генов в колбачковых фоторецепторах, необходимых для нормальной функции

колбачковых фоторецепторов, включая, но, не ограничиваясь субъединицей альфа-2 гуаниннуклеотидсвязывающего белка G(t) (GNAT2), управляемым циклическими нуклеотидами катионным каналом альфа-3 (CNGA3), управляемым циклическими нуклеотидами катионным каналом бета-3 (CNGB3), субъединицей альфа' колбачковой цГМФ-специфичной 3',5'-циклической фосфодиэстеразы (PDE6C), субъединицей гамма цГМФ-специфичной 3',5'-циклической фосфодиэстеразы, чувствительной к родопсину колбочек сетчатки (PDE6H), членом 2 подсемейства V калиевых потенциалзависимых каналов (KCNV2) и субъединицей альфа-2/дельта-4 потенциалзависимых кальциевых каналов (CACNA2D4), которые представляют собой важнейшие белки для нормального функционирования колбочек. В связи с этим, согласно настоящему изобретению предложены TCU и способы экспрессии, например, генов *GNAT2*, *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *KCNV2* и *CACNA2D4* в колбачковых фоторецепторах. Гены *PDE6C*, *GNAT2*, *CNGA3* и *CNGB3* являются четырьмя из генов, способствующих ахроматопсии. *PDE6C* представляет собой субъединицу альфа колбачковой цГМФ-специфичной 3',5'-циклической фосфодиэстеразы. *GNAT2* представляет собой компонент колбачкового трансдуцина, важнейшего элемента каскада фототрансдукции в колбочках. *CNGA3* представляет собой субъединицу альфа колбачкового ионного канала, управляемого циклическими нуклеотидами, который закрывается в ответ на свет, вследствие этого, осуществляя гиперполяризацию колбачковой клетки.

20

### **Экспрессионные конструкции**

Согласно изобретению также предложены экспрессионные конструкции, содержащие TCU, раскрытую в данном документе, функционально связанную с последовательностью, такой как последовательность гена, подлежащего экспрессии, образом, специфичным в отношении колбачкового фоторецептора.

25

Термин «функционально связанный» относится к непосредственному соседству, при котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим образом. Контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, сравнимых с контрольными последовательностями. Множественные копии того же или отличного полинуклеотида могут быть введены в экспрессионную конструкцию. Экспрессионная конструкция может быть определена как полинуклеотидная последовательность, способная управлять экспрессией белка с полинуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность.

30

Таким образом, экспрессионная конструкция может, например, содержать *PDE6H*, *PDE6C*, *GNAT2*, *KCNV2*, *CACNA2D4*, *CNGA3* или *CNGB3* кодирующую последовательность, например, полинуклеотид, выбранный из SEQ ID NO: 7 - 14, или

35

вариант SEQ ID NO: 7 – 14, который сохраняет функциональность белка, транскрибируемого с последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 7 - 14.

Вариант полинуклеотида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-14, может быть определен как любой вариант последовательности SEQ ID NO: 7 - 14, включая встречающиеся в природе варианты в последовательности нуклеиновой кислоты. Вариант может быть определен как обладающий по меньшей мере примерно 60%-ной, 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной идентичностью последовательностей с любой из SEQ ID NO 7 - 14, где полипептид, транскрибируемый с варианта последовательности, сохраняет свою функциональность. Вариант может быть определен как обладающий по меньшей мере примерно 60%-ной, 70%-ной, 80%-ной, 90%-ной, 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной идентичностью последовательностей с любой из SEQ ID NO 7 - 14, где полипептид, транскрибируемый с варианта последовательности, обладает способностью восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора. В воплощениях данный вариант представляет собой версию кодирующей последовательности с оптимизированными кодонами.

Экспрессионные конструкции, рассматриваемые раскрытием, могут восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора. Восстановление функции колбочкового фоторецептора может быть определено как восстановление по меньшей мере примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% функции колбочкового фоторецептора. Функцию колбочкового фоторецептора можно анализировать любой подходящей стандартной методикой, известной специалисту в данной области, например, посредством анализа реакций сетчатки на основе электроретинографии.

Восстановление функции колбочкового фоторецептора может также быть определено как продление выживаемости колбочек. Продление выживаемости колбочек может определяться как увеличение периода времени, на протяжении которого колбочковый фоторецептор является функциональным, примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% или более чем 100%, по сравнению с колбочковым фоторецептором, находящимся под действием колбочковой дистрофии. Функцию колбочкового фоторецептора можно анализировать любой подходящей стандартной методикой, известной специалисту в данной области, например, посредством анализа реакций сетчатки на основе электроретинографии. Примеры продления выживаемости колбочек также включают улучшение ERG активности или замедление потери ERG активности, улучшение чувствительности сетчатки или замедление/прекращение потери зрения.

Экспрессионная конструкция по изобретению может содержать TCU, функционально связанную с геном *CNGA3*. В некоторых воплощениях

последовательность гена *CNGA3* содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях ген *CNGA3* содержит последовательность с оптимизированными кодонами. Фраза «оптимизация кодонов» относится к способу изменения встречающейся в природе полинуклеотидной последовательности для усиления экспрессии в целевом организме, например, у человека. В одном воплощении настоящего изобретения человеческий ген *CNGA3*, SEQ ID NO: 7, был оптимизирован с созданием SEQ ID NO: 8. В ДНК данного оптимизированного *CNGA3* SEQ ID NO: 8 немногочисленные кодоны были заменены кодонами, которые более часто встречаются и/или кодонами, которые часто обнаруживаются в человеческих генах, экспрессируемых на высоком уровне.

В одном воплощении экспрессионная конструкция содержит TCU, функционально связанную с SEQ ID NO: 8.

### Векторы

Согласно изобретению предложены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, TCU, промоторы и их фрагменты, оптимизированные гены и экспрессионные конструкции, раскрытые в данном документе. Вектор может быть любого типа, например, он может представлять собой плазмидный вектор или миникольцевую ДНК.

Эффективность терапии, в общем, зависит от надлежащей и эффективной доставки донорской ДНК. Данный способ обычно опосредован вирусными векторами. В связи с этим, согласно изобретению предложены вирусные векторы, которые могут быть основаны, например, на вирусе простого герпеса, аденовирусе или лентивирусе. Вирусный вектор может представлять собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV - от англ. adeno-associated virus) или его производное. AAV представляет собой особенно привлекательный вектор, поскольку он обычно является непатогенным; большинство людей были инфицированы данным вирусом на протяжении своей жизни без неблагоприятных последствий. Иммунная привилегия ткани глаза, результат анатомических барьеров и иммуномодулирующих факторов, делает глаз главным образом свободным от пагубных иммунологических реакций.

В одном воплощении вирусный вектор содержит геном AAV из серотипа природного происхождения, изолят или кладу AAV или их производное.

Термин «геном AAV» представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует функции, необходимые для получения вирусной частицы AAV. Данные функции включают функции, работающие в цикле репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине, включая капсидирование генома AAV в вирусную частицу AAV. Встречающиеся в природе вирусы AAV являются дефектными по репликации и полагаются на наличие хэлперных функций в *trans* для завершения цикла репликации и упаковки. Соответственно и с дополнительным удалением AAV *rep* и *cap* генов геном AAV вектора по изобретению является дефектными по репликации.

Геном AAV может находиться в виде одной цепи, или смысловой или антисмысловой, или в качестве альтернативы в виде двух цепей. Применение двухцепочечной формы позволяет обойти стадию репликации ДНК в клетке-мишени и таким образом может ускорять экспрессию трансгена.

5           Геном AAV может происходить из любого серотипа или изолята или клады AAV природного происхождения. Как известно специалисту, вирусы AAV, встречающиеся в природе, можно классифицировать в соответствии с разными биологическими системами.

Обычно, ссылаются на вирусы AAV с учетом их серотипа. Термин «серотип» соответствует подвиду-варианту AAV, который, благодаря своему профилю экспрессии  
10           поверхностных антигенов капсида, обладает отличительной реактивностью, которую можно использовать для того, чтобы отличить его от других подвидов-вариантов. Обычно вирус, имеющий конкретный AAV серотип, эффективно не вступает в перекрестную реакцию с нейтрализующими антителами, специфичными к любому другому серотипу AAV. Серотипы AAV включают AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,  
15           AAV10 и AAV11, также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, недавно идентифицированные из мозга приматов. В векторах по изобретению геном может происходить из любого серотипа AAV. Капсид может также происходить из любого серотипа AAV. Геном и капсид могут происходить из одного и того же серотипа или разных серотипов.

20           В одном воплощении геном вектора, раскрытого в данном документе, происходит из серотипа 2 AAV (AAV2), серотипа 4 AAV (AAV4), серотипа 5 AAV (AAV5) или серотипа 8 AAV (AAV8). Другие векторы AAV, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из AAV44.9 и AAV-Апс80. Наиболее предпочтительно, чтобы геном происходил из AAV2, который связывается с клетками-мишенями посредством рецептора  
25           гепаринсульфат-протеогликанов, но другие серотипы, представляющие особый интерес для применения в изобретении, включают AAV4, AAV5 и AAV8, которые эффективно трансдуцируют ткань в глазу, как например, пигментный эпителий сетчатки.

Последовательности геномов AAV или элементов геномов AAV, включая последовательности ITR, гены гер или сар для применения в изобретении, могут  
30           происходить из следующих учетных номеров для последовательностей полного генома AAV: аденоассоциированный вирус 1 NC\_002077, AF063497; аденоассоциированный вирус 2 NC\_001401; аденоассоциированный вирус 3 NC\_001729; аденоассоциированный вирус 3В NC\_001863; аденоассоциированный вирус 4 NC\_001829; аденоассоциированный вирус 5 Y18065, AF085716; аденоассоциированный вирус 6  
35           NC\_001862; птичий AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC\_004828; птичий AAV штамм DA-1 NC\_006263, AY629583; бычий AAV NC\_005889, AY388617.

На вирусы AAV могут также ссылаться, имея в виду клады или клоны. Это относится к филогенетическому родству вирусов AAV природного происхождения и

обычно к филогенетической группе вирусов AAV, которые могут восходить к общему предку, и включает всех его потомков. Кроме того, на вирусы AAV могут ссылаться, имея в виду конкретный изолят, а именно генетический изолят конкретного вируса AAV, обнаруженного в природе. Термин «генетический изолят» описывает популяцию вирусов AAV, которая подвергалась ограниченному генетическому смешиванию с другими встречающимися в природе вирусами AAV, определяя, таким образом, узнаваемо отличающуюся популяцию на генетическом уровне.

Примеры клад и изолятов AAV, которые могут быть использованы в изобретении, включают следующее:

10 Клада А: AAV1 NC\_002077, AF063497, AAV6 NC\_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609,

Клада В: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49  
15 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC\_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,

Клада С: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55  
20 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623,

Клада D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, Cy2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6  
25 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013,

Клада E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563,  
30 Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rh61 AY530572, Rh52 AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556,

Клада F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, клональный изолят AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC\_001729, AAV 3B NC\_001863, AAV4  
35 NC\_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

Специалист может выбрать соответствующий серотип, кладу, клон или изолят AAV для применения в настоящем изобретении на основе их общеизвестного общего знания.

Однако, следует понимать, что изобретение также охватывает применение генома AAV других серотипов, которые могут еще не быть идентифицированы или охарактеризованы. Серотип AAV определяет тканеспецифичность инфекции (или тропизм) вируса AAV. Соответственно, предпочтительные серотипы AAV для применения в вирусах AAV, вводимых пациентам в соответствии с изобретением, представляют собой серотипы AAV, которые обладают природным тропизмом в отношении или высокой эффективностью инфицирования целевых колбочковых фоторецепторных клеток.

AAV дикого типа, содержащие вирусные гены, вставляют свой геномный материал в хромосому 19 клетки-хозяина. В геноме на основе одноцепочечной ДНК AAV содержится два инвертированных концевых повтора (ITR – от англ. inverted terminal repeat) и две открытые рамки считывания, содержащие структурные (*cap*) упаковывающие (*rep*) гены.

Обычно геном AAV серотипа или изолята или клады AAV природного происхождения содержит по меньшей мере одну последовательность инвертированного конечного повтора (ITR). Векторы по изобретению обычно содержат два ITR, предпочтительно один на каждом конце генома. Последовательность ITR действует в *cis* с обеспечением функциональной точки начала репликации и обеспечивает интеграцию и вырезание вектора из генома клетки. Предпочтительные последовательности ITR представляют собой последовательности AAV2 и их варианты. Геном AAV обычно содержит упаковывающие гены, такие как гены *rep* и/или *cap*, которые кодируют функции упаковывания для вирусной частицы AAV. Ген *rep* кодирует один или более белков Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40 или их вариантов. Ген *cap* кодирует один или более капсидных белков, таких как VP1, VP2 и VP3 или их варианты. Данные белки составляют капсид вирусной частицы AAV. Капсидные варианты обсуждаются ниже.

В терапевтических целях ITR могут быть предоставлены *in cis* помимо терапевтического гена. Вирус AAV может, таким образом, быть модифицирован: вирусные гены могут быть удалены из генома, получая рекомбинантный AAV (rAAV). rAAV содержит терапевтический ген и по меньшей мере один ITR. Удаление вирусных генов делает rAAV неспособным активно вставлять свой геном в ДНК клетки-хозяина. Вместо этого, геномы rAAV сливаются посредством ITR, образуя кольцевые, эписомальные структуры, или вставляются в предварительно существующие хромосомные разрывы. Для получения вирусов структурные и упаковывающие гены, теперь удаленные из rAAV, подаются *in trans*, в виде хэлперной плазмиды.

Предпочтительно геном AAV будет дериватизирован в целях введения пациентам. Такая дериватизация является стандартной в данной области, и настоящее изобретение охватывает применение любого известного производного генома AAV и производных, которые могли бы быть получены посредством применения методик, известных в данной области.

Производные генома AAV включают любые усеченные или модифицированные формы генома AAV, которые делают возможной экспрессию трансгена Rep-1 из вектора по изобретению *in vivo*. Обычно, возможно значительно усекать геном AAV для включения минимальной вирусной последовательности, которая еще сохраняет  
5 указанную выше функцию. Это является предпочтительным по причинам безопасности для снижения риска рекомбинации вектора с вектором дикого типа, и также для избегания стимуляции клеточного иммунного ответа за счет присутствия белков вирусных генов в целевой клетке.

Обычно производное будет включать по меньшей мере одну последовательность  
10 инвертированного конечного повтора (ITR), предпочтительно более чем один ITR, как например, два ITR или более. Один или более ITR могут происходить из геномов AAV, имеющих разные серотипы, или могут представлять собой химерный или мутантный ITR. Предпочтительный мутантный ITR представляет собой ITR, имеющий делецию *trs* (сайт концевое разрешение). Данная делеция делает возможной непрерывную репликацию  
15 генома с генерацией одноцепочечного генома, который содержит как кодирующие, так и комплементарные последовательности, а именно самокомплементарного генома AAV. Это обеспечивает обходной путь для репликации ДНК в целевой клетке, и, таким образом, обеспечивает ускоренную экспрессию трансгена.

Один или более ITR будут предпочтительно фланкировать экспрессионную  
20 конструкцию-кассету, содержащую промотор и трансген по изобретению. Включение одного или более ITR предпочтительно для помощи в упаковке вектора по изобретению в вирусные частицы. В предпочтительных воплощениях элементы ITR будут единственными последовательностями, сохранившимися от нативного генома AAV в производном. Таким образом, производное предпочтительно не будет включать гены *rep*  
25 и/или *cap* нативного генома и любые другие последовательности нативного генома. Это является предпочтительным по причинам, описанным выше, и также для уменьшения возможности интеграции вектора в геном клетки-хозяина. Кроме того, уменьшение размера генома AAV обеспечивает повышенную гибкость во включении других элементов последовательности (таких как регуляторные элементы) в пределах вектора помимо  
30 трансгена.

Со ссылкой на геном AAV2, следующие части могли бы, таким образом, быть удалены в производном по изобретению: одна последовательность инвертированного  
концевого повтора (ITR), гены репликации (*rep*) и капсида (*cap*). Однако, в некоторых воплощениях, включая воплощения *in vitro*, производные могут дополнительно включать  
35 один или более генов *rep* и/или *cap*, или другие вирусные последовательности генома AAV.

Производное может быть химерным, «перетасованным» или капсид-модифицированным производным одного или более встречающихся в природе вирусов

AAV. Изобретение охватывает предоставление белковых последовательностей капсида из разных серотипов, клад, клонов или изолятов AAV в том же векторе. Изобретение охватывает упаковку генома одного серотипа в капсид другого серотипа, а именно псевдотипирование.

5 Химерные, «перетасованные» или капсид-модифицированные производные будут обычно выбраны для предоставления одной или более желательных функциональностей для вирусного вектора. Таким образом, данные производные могут демонстрировать повышенную эффективность доставки генов, пониженную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный диапазон тропизма и/или улучшенное нацеливание  
10 конкретного типа клетки, по сравнению с вирусным вектором AAV, содержащим встречающийся в природе геном AAV, как например, вектором AAV2. На повышенную эффективность доставки гена может влиять улучшенный рецептор или корецептор, связывающийся на клеточной поверхности, улучшенная интернализация, улучшенная миграция в клетке и в ядро, улучшенная декапсидация вирусной частицы и улучшенное  
15 превращение одноцепочечного генома в двухцепочечную форму. Повышенная эффективность может также относиться к измененному диапазону тропизма или нацеливанию конкретной популяции клеток, таким образом, что доза вектора не разовьется в результате введения в ткани, где это не является необходимым.

Химерные капсидные белки включают белки, образованные в результате  
20 рекомбинации между двумя или более последовательностями, кодирующими капсид, встречающихся в природе серотипов AAV. Это можно осуществлять, например, посредством подхода на основе спасения генетического маркера, в котором неинфекционные последовательности капсида одного серотипа совместно трансфицируют последовательностями капсида другого серотипа, и направленную  
25 селекцию используют для отбора последовательностей капсида, имеющих желательные свойства. Последовательности капсида разных серотипов могут изменяться в результате гомологичной рекомбинации в клетке с получением новых химерных капсидных белков.

Химерные капсидные белки также включают белки, образованные посредством  
30 конструирования последовательностей капсидного белка для переноса конкретных доменов капсидного белка, поверхностных петель или конкретных аминокислотных остатков между двумя или более капсидными белками, например, между двумя или более капсидными белками разных серотипов.

«Перетасованные» или химерные капсидные белки могут также быть образованы в результате «перетасовки» ДНК или посредством ПЦР, допускающей ошибки. Гибридные  
35 гены капсида AAV могут создаваться посредством случайного фрагментирования последовательностей родственных генов AAV, например, генов, кодирующих капсидные белки множества разных серотипов, и затем последующей повторной сборки фрагментов в полимеразной реакции с самопраймированием, которая может также вызывать

кроссинговер в областях гомологии последовательностей. Можно осуществлять скрининг библиотеки гибридных генов AAV, созданной таким образом посредством «перетасовки» генов капсида нескольких серотипов, для идентификации вирусных клонов, обладающих желательной функциональностью. Аналогично, ПЦР, допускающую ошибки, можно использовать для мутирования случайным образом генов капсида AAV с созданием отличной библиотеки вариантов, которые затем могут быть отобраны за желаемое свойство.

Последовательности генов капсида могут быть также генетически модифицированы с введением конкретных делеций, замен или вставок относительно нативной последовательности дикого типа. В частности, гены капсида могут быть модифицированы вставкой последовательности неродственного белка или пептида в пределах открытой рамки считывания последовательности, кодирующей капсид, или на N- и/или C-конце последовательности, кодирующей капсид.

Неродственный белок или пептид может преимущественно представлять собой белок, который действует в качестве лиганда для конкретного типа клеток, придавая, вследствие этого, улучшенное связывание с клеткой-мишенью или улучшая специфичность нацеливания вектора на конкретную популяцию клеток.

Неродственный белок может также представлять собой белок, который помогает очистке вирусной частицы как часть способа получения, а именно эпитоп или аффинную метку. Сайт вставки будет обычно выбран таким образом, чтобы не мешать другим функциям вирусной частицы, например, интернализации, миграции вирусной частицы. Специалист может идентифицировать подходящие сайты для вставки на основе своего общеизвестного общего знания.

Изобретение дополнительно охватывает предоставление последовательностей генома AAV в другом порядке и конфигурации, по сравнению с порядком и конфигурацией нативного генома AAV. Изобретение также охватывает замещение одной или более последовательностей AAV или генов последовательностями от другого вируса или химерными генами, состоящими из последовательностей из более чем одного вируса. Такие химерные гены могут состоять из последовательностей из двух или более родственных вирусных белков разных видов вирусов.

Вектор по изобретению принимает вид вирусного вектора, содержащего промоторы и экспрессионные конструкции по изобретению.

Во избежание неоднозначного толкования согласно изобретению также предложена вирусная частица AAV, содержащая вектор по изобретению. Частицы AAV по изобретению включают транскарпидированные формы, где геном AAV или производное, имеющее ITR одного серотипа, упаковывается в капсид другого серотипа. Частицы AAV по изобретению также включают мозаичные формы, где смесь немодифицированных белков капсида от двух или более разных серотипов составляет вирусную оболочку.

Частица AAV также включает химически-модифицированные формы, несущие лиганды, адсорбированные на поверхности капсида. Например, такие лиганды могут включать антитела для нацеливания на конкретный рецептор клеточной поверхности.

5 Геном AAV2, подобно геномам всех серотипов AAV, может быть заключен в целый ряд разных капсидных белков. AAV2 может быть упакован в свой природный капсид AAV2 (AAV2/2), или он может быть псевдотипирован с помощью других капсидов (например, геном AAV2 в капсиде AAV1, что приводит к получению AAV2/1, или геном AAV2 в капсиде AAV8, что приводит к получению AAV2/8).

10 В предпочтительном воплощении капсид AAV происходит из AAV8. В особенно предпочтительном воплощении, где функционально связанная последовательность представляет собой ген *CNGA3*, предпочтительно, чтобы капсид представлял собой AAV8 или другой капсид, отличный от AAV5.

AAV трансдуцирует клетки посредством эндоцитоза, опосредованного серотип-специфичным рецептором. Главным фактором, влияющим на кинетику экспрессии трансгена *gAAV*, является скорость декапсидации вирусной частицы в пределах эндосомы. Это, в свою очередь, зависит от типа капсида, заключающего генетический материал. После декапсидации линейный одноцепочечный геном *gAAV* стабилизируется в результате образования двухцепочечной молекулы посредством синтеза *de novo* комплементарной цепи. При применении самокомплементарной ДНК можно обходить  
15 данную стадию посредством образования двухцепочечной трансгенной ДНК. Обнаружили, что экспрессия самокомплементарного гена AAV2/8 имеет более быстрое начало и более высокую амплитуду, по сравнению с одноцепочечным AAV2/8. Таким образом, в результате избегания временной задержки, ассоциированной с синтезом второй цепи, уровни экспрессии генов повышаются, по сравнению с экспрессией  
25 трансгена со стандартных одноцепочечных конструкций. Последующие исследования, изучающие действие самокомплементарной ДНК в других псевдотипах AAV, дали похожие результаты. Одна оговорка в отношении данной методики заключается в том, что поскольку AAV обладает упаковочной емкостью приблизительно 4,8 т.п.н., самокомплементарный рекомбинантный геном должен быть соответствующего размера  
30 (а именно 2,3 т.п.н. или меньше).

Помимо модификации упаковочной емкости, псевдотипирование генома AAV2 с другими капсидами AAV может изменять клеточную специфичность и кинетику экспрессии трансгена. Например, когда AAV2 псевдотипирован с использованием капсида AAV4, экспрессия трансгена специфично нацелена на клетки RPE (от англ. retinal pigment epithelium - пигментный эпителий сетчатки). Кроме того, сообщается, что AAV2/8 трансдуцирует фоторецепторы более эффективно, чем AAV2/2 или AAV2/5.

## Получение векторов

Вектор по изобретению может быть получен стандартными средствами, известными в данной области, для получения векторов для терапии. Таким образом, хорошо разработанные общедоступные способы трансфекции, упаковки и очистки могут быть использованы для получения подходящего препарата вектора.

5 Как обсуждалось выше, вектор по изобретению может содержать полный геном встречающегося в природе вируса AAV помимо промотора по изобретению или его вариант. Однако, обычно будет использоваться дериватизированный геном, например, производное, которое имеет по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), но которое может не иметь генов AAV, таких  
10 как *rep* или *cap*.

В таких воплощениях для обеспечения сборки дериватизированного генома в вирусную частицу AAV дополнительные генетические конструкции, обеспечивающие функции AAV и/или хэлперного вируса, могут быть предоставлены в клетке-хозяине в комбинации с дериватизированным геномом. Данные дополнительные конструкции будут  
15 обычно содержать гены, кодирующие структурные капсидные белки AAV, а именно *cap*, VP1, VP2, VP3 и гены, кодирующие другие функции, требующиеся для жизненного цикла AAV, такие как *rep*. Селекция структурных капсидных белков, предоставленных на дополнительной конструкции, будет определять серотип упакованного вирусного вектора.

Особенно предпочтительный упакованный вирусный вектор для применения в изобретении содержит дериватизированный геном AAV2 в комбинации с капсидным белком AAV8.  
20

Как упоминается выше, вирусы AAV с дефектом по репликации, и таким образом функции хэлперного вируса, предпочтительно функции аденовируса- хэлпера, могут быть предоставлены на одной или более дополнительных конструкциях для обеспечения  
25 репликации AAV. Также существуют системы, известные специалисту, в которых используется одна единственная конструкция, которая содержит *rep*, *cap* и функции Ad-хэлпера, таким образом, дополнительные хэлперные конструкции не требуются.

Все из упомянутых выше дополнительных конструкций могут быть предоставлены в виде плазмид или других эписомальных элементов в клетке-хозяине, или в качестве  
30 альтернативы одна или более конструкций могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина.

Единица контроля транскрипции по изобретению обладает способностью восстанавливать потерю функции колбочкового фоторецептора, которая может происходить, например, в результате мутаций в гене *CNGA3*. Термин «восстановление»  
35 обычно означает любое улучшение или замедление прогрессирования нарушения сетчатки или фенотипа дистрофии, например, восстановление наличия белка CNGA3 в колбочковом фоторецепторе, улучшение ERG активности или замедление потери ERG активности, улучшение чувствительности сетчатки или замедление/остановку

прогрессирующей потери чувствительности сетчатки, замедление или остановку потери фоторецепторных клеток, улучшение зрения или замедление/остановку потери зрения.

Свойства единицы контроля транскрипции по изобретению можно также тестировать, используя методики на основе методик в разделе Примеры. В частности, единица контроля транскрипции по изобретению может быть собрана в вектор по изобретению и доставлена в сетчатку *CNGA3*-дефицитного тестируемого животного, такого как мышь, и эффекты наблюдали и сравнивали с контролем. Предпочтительно, контролем будет другой глаз того же животного, который или не обработан, или обработан контрольным вектором, таким как вектор, содержащий репортерный ген, по сравнению с последовательностью по изобретению. Анализ на основе электроретинографии реакций сетчатки на свет может затем использоваться для подтверждения того, что фоторецепторные клетки в глазах, которые обработаны, более чувствительны к свету, чем фоторецепторы из глаз, которые не обработаны или обработаны контрольным вектором. Чувствительность обработанного глаза к свету может, например, быть по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз больше, чем чувствительность необработанного или обработанного контролем глаза.

#### **Способы терапии и медицинские применения**

В одном аспекте согласно изобретению предложены молекулы нуклеиновой кислоты (такие как TCU, промоторы и их фрагменты, гены с оптимизацией кодонов, экспрессионные конструкции и векторы), а также способы лечения и/или предупреждения нарушений сетчатки или дистрофий у пациента, нуждающегося в этом.

Сетчатка состоит из слоя клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) и трех слоев нейросенсорных клеток; а именно (от внешнего к внутреннему), внешнего ядерного слоя (содержащего палочковые и колбочковые фоторецепторные клетки), внутреннего ядерного слоя (содержащего биполярные клетки) и слоя ганглиозных клеток. Нарушения сетчатки или дистрофии могут быть определены как заболевания сетчатки, характеризующиеся прогрессирующей потерей фоторецепторных клеток и сопутствующей потерей зрения. Нарушения сетчатки или дистрофии могут представлять собой наследственные нарушения сетчатки или дистрофии.

В одном воплощении предложены молекулы нуклеиновой кислоты и способы лечения и/или предупреждения колбочко-палочковой дистрофии и/или колбочковой дистрофии. Колбочко-палочковые дистрофии могут быть определены как заболевания, характеризующиеся прогрессирующей потерей колбочковых фоторецепторных клеток и сопутствующей потерей зрения и могут быть наследственными. В одном воплощении нарушение сетчатки представляет собой ахроматопию или макулодистрофию. Макулодистрофия может представлять собой возрастную макулярную дегенерацию

(ВМД), например, влажную форму или неоваскулярную ВМД, или географическую атрофию, наследственное состояние макулярной дегенерации или ненаследственную колбочковую дистрофию.

Термины «пациент» и «субъект» могут использоваться взаимозаменяемо. Пациент предпочтительно представляет собой млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой коммерчески выращенное животное, такое как лошадь, корова, овца или свинья, лабораторное животное, такое как мышь или крыса, или домашнее животное, такое как кошка, собака, кролик или морская свинка. Пациент более предпочтительно представляет собой человека. Субъект может предпочтительно представлять собой мужчину или женщину. Субъект предпочтительно идентифицирован как находящийся в группе риска или имеющий нарушение сетчатки или дистрофию.

Термины «лечить», «проходящий лечение», «лечащий» или «лечение», в том виде, в котором они используются в данном документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, или получение полезных или желательных клинических результатов. В целях данного изобретения полезные или желательные результаты включают облегчение симптомов; снижение степени тяжести состояния, расстройства или заболевания; стабилизацию (то есть отсутствие ухудшения) статуса состояния, расстройства или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; улучшение состояния, расстройства или течения заболевания; и ремиссию (или частичную или полную), как выявляемую, так и невыявляемую, или усиление или улучшение состояния, расстройства или заболевания, но не ограничиваются ими. Лечение включает вызывание клинически значимой реакции без избыточных уровней побочных эффектов.

Пациент может быть бессимптомным и/или может иметь предрасположенность к заболеванию. В связи с этим, согласно изобретению также предложен способ или применение, которые включают стадию идентификации того, находится ли субъект в группе риска развития или имеет ли нарушения сетчатки, такие как колбочковые дистрофии, включая, но, не ограничиваясь ахроматопсией, или нет. Профилактически эффективное количество нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, может быть введено такому субъекту. Профилактически эффективное количество представляет собой количество, которое предотвращает начало одного или более симптомов заболевания. В связи с этим, в некоторых воплощениях нуклеиновую кислоту, такую как вектор, как раскрыто в данном документе, можно вводить для предотвращения или задержки начала одного или более симптомов нарушений сетчатки, таких как колбочко-палочковые дистрофии, включая, но, не ограничиваясь ахроматопсией. В качестве альтернативы, нуклеиновую кислоту, такую как вектор, как

раскрыто в данном документе, можно вводить, как только у субъекта появились симптомы заболевания, а именно для излечения существующих симптомов заболевания. Такому субъекту можно вводить терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе. В том виде, в котором он  
5 используется в данном документе, термин «терапевтически эффективное количество» означает количество нуклеиновой кислоты, охарактеризованной в данном документе, которое, при введении млекопитающему, является эффективным в получении желательного терапевтического эффекта. В одном воплощении согласно изобретению предложены способы лечения и/или предупреждения нарушения или дистрофии  
10 сетчатки, где нуклеиновую кислоту, такую как вектор, как раскрыто в данном документе, вводят пациенту, нуждающемуся в терапевтически эффективном количестве. В некоторых воплощениях нарушение или дистрофия сетчатки представляет собой колбочковую дистрофию, включая, но, не ограничиваясь ахроматопсией.

Согласно изобретению также предложено применение нуклеиновой кислоты, такой  
15 как вектор, как раскрыто в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения нарушений или дистрофий сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, включая, но, не ограничиваясь ахроматопсией. Согласно изобретению также предложен способ лечения или предупреждения нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, в частности ахроматопсия, у пациента, нуждающегося  
20 в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе.

### **Способы введения**

В общем, предпочтительной является доставка прямо в сетчатку, субретинальная  
25 или интравитреальная доставка нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, обычно посредством инъекции. Таким образом, предпочтительной является доставка в пространство сетчатки, субретинальное пространство или интравитреальное пространство.

Таким образом, согласно изобретению также предложен способ лечения или  
30 предупреждения колбочковых дистрофий, в частности, ахроматопсии, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, посредством инъекции прямо в сетчатку, субретинальной или интравитреальной инъекции.

35 В родственном аспекте согласно изобретению предложено применение нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, в способе лечения или предупреждения нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, в частности, ахроматопсия, посредством введения пациенту указанного вектора

посредством инъекции прямо в сетчатку, субретинальной или интравитреальной инъекции.

Кроме того, согласно изобретению предложено применение нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, в частности, ахроматопсия, посредством инъекции прямо в сетчатку, субретинальной или интравитреальной инъекции.

Согласно изобретению также предложена нуклеиновая кислота, такая как вектор, как раскрыто в данном документе, для применения в лечении нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, в частности, ахроматопсия, где указанный вектор вводят непосредственно в пространство сетчатки, субретинальное пространство или интравитреальное пространство.

Введение нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, обычно осуществляется посредством инъекции прямо в сетчатку или субретинальной инъекции. Это включает непосредственную доставку в колбочковые фоторецепторные клетки.

Доставку осуществляют обычно прямо к или субретинально к дегенерирующей сетчатке у пациента, страдающего от нарушений сетчатки, таких как колбочко-палочковые дистрофии, в частности, ахроматопсия.

Нуклеиновая кислота, такая как вектор, как раскрыто в данном документе, может трансдуцировать указанные выше целевые клетки без введения каких-либо других популяций клеток. Интравитреальную инъекцию можно также использовать для доставки вектора по изобретению.

Дозу нуклеиновой кислоты, такой как вектор, как раскрыто в данном документе, можно определять в соответствии с разными параметрами, особенно в соответствии с возрастом, массой и состоянием пациента, подлежащего лечению; путем введения; и требующейся схемой. Кроме того, лечащий врач сможет определить требующийся путь введения и дозировку для какого-то конкретного пациента.

Обычная однократная доза составляет от  $10^{10}$  до  $10^{12}$  частиц генома, в зависимости от количества остающейся ткани сетчатки, которая требует трансдукции. Частица генома определяется в данном документе, как капсид AAV, который содержит одноцепочечную молекулу ДНК, которую можно количественно оценивать способом, специфичным в отношении последовательности (таким как ПЦР в реальном времени). Эта доза может быть предложена в виде одиночной дозы, но может повторяться для второго глаза или в случаях, когда нуклеиновая кислота, такая как вектор, как раскрыто в данном документе, может не оказаться нацеленной на правильную область сетчатки по какой-либо причине (такой как послеоперационное осложнение). Лечение предпочтительно представляет собой одно постоянное лечение каждого глаза, но можно

рассматривать повторные инъекции, например, в будущем и/или с разными серотипами AAV.

#### **Клетки-хозяева**

5 Согласно изобретению дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, такую как вектор или вирусный вектор, или вирусная частица AAV, раскрытая в данном документе. Любая подходящая клетка-хозяин может использоваться для получения нуклеиновых кислот, таких как векторы, раскрытые в данном документе. Обычно, такие клетки будут представлять собой трансфицированные клетки

10 млекопитающего, но также можно использовать другие типы клеток, например, клетки насекомого. Что касается систем продуцирования на основе клеток млекопитающего, HEK293 и HEK293T являются предпочтительными для векторов AAV. Также можно использовать клетки ВНК (от англ. Baby Hamster Kidney - почка новорожденного хомячка) или СНО (от англ. Chinese Hamster Ovary - яичник китайского хомячка).

15

#### **Фармацевтические композиции и дозировки**

Кроме того, согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, такую как вектор, раскрытый в данном документе, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество,

20 адъювант, буфер, стабилизатор и/или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного вещества. Также предложена фармацевтическая композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант, буфер, стабилизатор

25 и/или другие вещества, хорошо известные в данной области, и последовательность нуклеиновой кислоты, плазмиду, вектор или вирусный вектор, как описано в данном документе.

Точную природу носителя или другого вещества может определить специалист в соответствии с путем введения, а именно в данном документе инъекцией прямо в

30 сетчатку, субретинальной инъекцией или интравитреальной инъекцией.

Фармацевтическая композиция обычно находится в жидкой форме. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Можно включать физиологический раствор, раствор хлорида магния, декстрозы или

35 другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях можно использовать поверхностно-активное вещество, такое как плуронилловая кислота (PF68) 0,001%.

Для инъекции в месте поражения активное вещество будет находиться в форме водного раствора, который является апиrogenным и имеет подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области вполне могут приготовить подходящие растворы, используя, например, изотоничные носители, такие как инъекция хлорида натрия, раствор Рингера для инъекций, Рингер лактат для инъекций, раствор Хартмана. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть включены при необходимости.

Для отложенного высвобождения вектор может быть включен в фармацевтическую композицию, которая приготовлена для медленного высвобождения, как например, в микрокапсулах, образованных из биосовместимых полимеров, или в липосомальных системах-носителях в соответствии со способами, известными в данной области.

Дозировки и схемы дозирования могут быть определены в пределах стандартного профессионального знания врача-терапевта, ответственного за введение композиции. Дозировка активного агента(ов) может варьировать, в зависимости от причины применения, индивида и способа введения. Дозировку можно регулировать на основе массы субъекта, возраста и здоровья субъекта и переносимости соединения(ий) или композиции.

### **Комбинированные терапии**

Нуклеиновые кислоты, TCU, промоторы, гены с оптимизированными кодонами, экспрессионные конструкции, векторы и/или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, можно использовать в комбинации с любой другой терапией для лечения и/или предупреждения нарушений сетчатки, таких как колбочковые дистрофии, включая, но, не ограничиваясь ахроматопсией.

### **Наборы**

Нуклеиновые кислоты, TCU, промоторы, гены с оптимизированными кодонами, экспрессионные конструкции, векторы и/или фармацевтические композиции, раскрытые в данной области, могут быть упакованы в набор.

### **Примеры**

#### **Материалы и методы**

#### **Конструирование плазмиды**

Для создания улучшенной версии промотора зеленого колбочкового опсина локус-контролирующую область (LCR), размером 1250 п.н. (Smallwood et al., 2002), объединяли с разными фрагментами корового промотора зеленого опсина (п.н. от -480 до +40) в исходную плазмиду pAAV/CMV.eGFP, создавая плазмидную конструкцию

pAAV/hG1.7.eGFP и pAAV/hG1.4.eGFP. Конструкции-векторы, несущие промоторы с мутацией «M8», получали посредством сайт-направленного мутагенеза.

Для терапевтических генетических конструкций pAAV/coCNGA3 создавали посредством клонирования кодон- и Козак-оптимизированной последовательности CNGA3 из плазмиды pUC57 (полученной посредством GenScript) в плазмиду pAAV, несущую разные конструкции с промотором зеленого (M) колбачкового опсина.

#### **Оптимизация кодонов**

Оптимизацию кодонов достигали посредством инструмента для оптимизации кодонов OptimumGene™, являющегося собственностью GenScript.

#### **Протокол получения вируса AAV2/8 и AAV2/5**

Рекомбинантный вирус AAV2 серотипа 8 и вирус AAV2 серотипа 5 получали, используя тройную трансфекцию клеток 293T ранее описанным способом (Gao et al. 2002). 145 см<sup>2</sup> планшеты с клетками 293T (20 планшетов на вирусную партию) трансфицировали смесью, содержащей следующую исследуемую плазмиду: вирусная плазида капсида: хэлперная плазмидная ДНК в соотношении 1:1:3, полиэтиленимин (PEI - Polysciences Inc., Eppelheim, Германия) и DMEM, после 10-ти минутной инкубации. Трансфицированные клетки высаживали в течение 24 часов. Спустя 48 ч после трансфекции, клетки собирали, концентрировали посредством центрифугирования, ресуспендировали в TD буфере (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 0,7 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ трис-основание [pH равен 7,5]). Затем осуществляли лизис за 3-4 цикла замораживания-оттаивания с последующей обработкой Бензоназой (Sigma Aldrich, Dorset, UK), и затем продукт распада клеток удаляли посредством последовательных стадий центрифугирования и фильтрации на основе шприцевых фильтров.

Очистку проводили посредством ионообменной хроматографии (используя способ на основе способа Davidoff et al. 2004). Элюат концентрировали в 10 кДа трубке-концентраторе Vivaspin 4 (Sartorius Stedim Biotech, Fisher Scientific, Loughborough, UK), промывали в PBS-MK, затем концентрировали до объема 100-150 мкл, затем аликвотировали для хранения при -80°C (длительного) или +4°C (кратковременного).

#### **Получение и трансдукция органоидов сетчатки, происходящих из человеческой стволовой клетки**

Линии эмбриональных стволовых клеток H9 человека (ESC – от англ. embryonic stem cell) поддерживали в условиях, не содержащих фидерные клетки, в 6-луночных планшетах со средой E8 и покрытых geltrex. hESC диссоциировали, используя раствор диспазы и коллагеназы. Скопления ESC собирали и ресуспендировали в средах E8. Для дифференциации нейроэпителлия сетчатки человеческие ESC поддерживали до

достижения слияния клеток, когда среды без FGF (от англ. Fibroblast Growth Factor – фактор роста фибробластов) добавляли к культурам на протяжении двух дней. Среда для пронеуральной индукции (усовершенствованная DMEM/F12, заменимые аминокислоты MEM, добавка N2, 100 мМ Глутамин и Пен/Стреп (пенициллин/стрептомицин)) добавляли до тех пор, пока не наблюдалось глазных пузырьков. Пузырьки удаляли в ручную и хранили в 96-луночных планшетах в средах для дифференциации сетчатки (DMEM, F12, Пен/Стреп и B27 без ретиноевой кислоты), и через 6 недель дифференциации среду дополняли FBS (от англ. Fetal Bovine Serum - фетальная телячья сыворотка), таурином и glutamax, и через 10 недель добавляли RA.

Векторы AAV (серотип SsH10), несущие конструкции промотора зеленого колбачкового опсина, управляющие eGFP, добавляли к среде в количестве  $1,2 \times 10^{11}$  вг/лунка (1-3 органоида/лунка). Органоиды культивировали в течение еще 28 суток перед сбором и анализом.

### Иммуногистохимия

Глаза готовили для фиксации посредством прокалывания роговицы и затем погружали в 1%-ный формальдегид (PFA - от англ. paraformaldehyde, pH 7,4). Органоиды сетчатки фиксировали посредством погружения в 1%-ный параформальдегид (PFA, pH 7.4). Глаза оставляли для фиксации при комнатной температуре в течение вплоть до часа перед удалением из раствора и полностью погружали в матрицу для заключения при оптимальной температуре резания (OCT - от англ. optimal cutting temperature), причем переднезаднюю ось глаза суспендировали в горизонтально-вертикальной оси в пробирках для заключения. Затем их замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до тех пор, пока они не потребуются для изготовления срезов.

Срезы 10 - 18 микрон получали, используя криостат Bright® OTF5000 (Bright Instrument Co Ltd, Cambridgeshire, UK), что, таким образом, обеспечивало визуализацию как верхних, так и нижних отделов сетчатки. Срезы собирали сразу после изготовления срезов на предметные стекла микроскопа, покрытые полизином, и давали высохнуть на воздухе при комнатной температуре. Предметные стекла или хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ , или непосредственно анализировали.

Для иммуногистохимии срезы блокировали в 5%-ной козьей сыворотке и 1%-ном бычьем сывороточном альбумине в PBS (от англ. phosphate-buffered saline – фосфатно-солевой буферный раствор). Первичные антитела против колбачкового опсина (Millipore) инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Срезы инкубировали со вторичным антителом в течение 2 ч при RT (комнатная температура) и промывали. Вторичные антитела, меченые Alexa-fluor (Invitrogen-Molecular Probes), использовали при разведении 1:500. Срезы окрашивали DAPI (от англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole - 4', 6-диамидино-2-фенилиндол)

или в виде добавления к среде для заключения (0,1% DAPI в среде), или посредством погружения в 0,2% DAPI в TBS (от англ. tris-buffered saline - трис-буферизованный физиологический раствор) и PBS-промывки перед заключением в среду для заключения флуоресцентных препаратов (DAKO). Заключенные срезы хранили при 4°C.

5           Изображения заключенных срезов получали, используя конфокальный микроскоп Leica DM5500Q (Leica Biosystems, Германия) или Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss Inc, Göttingen, Германия).

### **Субретинальная инъекция**

10           Субретинальные инъекции осуществляли на мышах *Cpf15* (CNGA3-дефицитных) (Hawes et al., 2006) и C57BL/6 примерно 2 недели после рождения. Операционный микроскоп использовали на протяжении всей глазной хирургии. Иглу для подкожных инъекций, длиной 1,5 см, 34-калибра (Hamilton, Швейцария), тангенциально вставляли через склеру, создавая самозатягивающуюся рану склерального тоннеля (Tan et al. 2009).  
15   1,0 - 1,5 мкл вирусной суспензии инъецировали в верхнее и нижнее полушария субретинального пространства, причем в каждом случае происходила офтальмоскопически-видимая буллезная отслойка сетчатки. C57BL/6 использовали для исследования промотора и инъецировали титр вируса  $1 \times 10^{12}$ . Мышей *Cpf15* использовали в исследованиях восстановления CNGA3. Мышам инъецировали вирусные конструкции  
20 CNGA3 в намеченный глаз, причем контрольные вирусные конструкции инъецировали в контралатеральный глаз. Всем мышам проводили инъекции билатерально.

### **Эффективность обработки *in vivo***

25           Восстановление функции сетчатки оценивали посредством фотопической электроретинографии. Записи ERG получали с обоих глаз одновременно. После адаптации к темноте в течение ночи (приблизительно 12 часов) одну каплю 2,5% фенилэфрина и 1% тропикамида (Minims, Bausch & Lomb) наносили на каждый глаз для расширения зрачка, и глаза поддерживали во влажном состоянии посредством применения смазывающего вещества. ERG осуществляли, используя имеющееся в  
30   продаже оборудование (Espion ERG Diagnosys System). Записи фотопических сигналов с одним экстремумом получали при возрастании интенсивностей света 0,1, 1, 3,16, 10, 31,6 и 75,28 кд/м<sup>2</sup> на фоне 30 кд/м<sup>2</sup>. Если не указано иное, на Фигурах показаны средние фотопические амплитуды b-волны (среднее  $\pm$  SD (от англ. Standard Deviation - стандартное отклонение)) через 4 недели после обработки, когда векторы достигли  
35   максимальной экспрессии.

**Пример 1: Оптимизация специфичной в отношении колбочек единицы, контролирующей транскрипцию (TCU)**

Человеческая локус-контролирующая область (LCR), которая находится выше гена красного опсина, усиливает экспрессию как гена красного опсина (L-опсин), так и генов зеленого опсина (M-опсин), которые расположены в тандеме (см. Фиг. 1, слева вверху). Сильные промоторы, специфичные в отношении колбочек, ранее использовали LCR и промотор красного опсина, поскольку они представляют собой физически смежные элементы. В исследовании экспрессии репортерного гена *in vivo* у трансгенных мышей Smallwood et al исследовали разные уровни экспрессии или с промотора красного или зеленого опсина на основе их физической близости к LCR. Smallwood et al. конструировали несколько производных ряда человеческих красных и зеленых пигментов для демонстрации разных уровней экспрессии будь то с промотора красного опсина, или с промотора зеленого опсина, на основе их физической близости с LCR (см. Фиг. 1, снизу слева). Каждое производное состояло из репортерного гена щелочной фосфотазы (AP – от англ. alkaline phosphatase) под контролем промотора красного опсина и  $\beta$ -галактозидазы (LacZ) под контролем промотора зеленого опсина. Для каждой линии эмбриональных стволовых клеток сетчатки анализировали или от множественных химерных основателей, или от множественного потомства, которое стабильно наследовало трансген. В последнем случае, анализ проводили как перед, так и после скрещивания с мышами зародышевой линии сге с удалением кассеты с loxP-фланкированным PGK-neo.

В конструкции дикого типа, в которой используется природная хромосомная перестройка (pPMS107), 65–95% колбочек экспрессирует или AP (под контролем промотора красного опсина) или lacZ (под контролем промотора зеленого опсина), но не ту и другую. Вставка спейсера, размером 9 т.п.н., между двумя единицами транскрипции (а именно, увеличение расстояния между LCR и промотором зеленого опсина, конструкция pPMS108) приводит к большому сдвигу от lacZ (зеленый промотор)- к AP (красный промотор)-экспрессирующим клеткам. Смена положений данных двух единиц транскрипции (pPMS101) и расположение корового промотора зеленого опсина сразу после LCR (pPMS101) сдвигало профиль экспрессии данных трансгенных мышей почти исключительно в направлении транскрипции под контролем корового промотора зеленого опсина (больше 99%).

Согласно данному раскрытию предложена альтернативная специфичная в отношении колбочек единица контроля транскрипции (TCU), использующая человеческую LCR и оптимизированный человеческий промотор зеленого опсина. Идентифицировали консервативный коровый элемент человеческого промотора зеленого опсина (0,2 т.п.н.), и генерировали целый ряд TCU, использующих сконструированные промоторы зеленого опсина, с использованием области LCR и промоторов зеленого опсина разных размеров: 2,0 т.п.н. (hG2.0), 1,7 т.п.н. (hG1.7) и 1,4 т.п.н. (hG1.4), см. Фиг. 2. Также в качестве

контроля генерировали фрагмент промотора красного опсина 1,7 т.п.н. (PR1,7, аналогичный промотору, используемому AGTC, Ye et al., 2016)).

Кроме того, генерировали целый ряд векторов AAVshh10, содержащих GFP репортеры, управляемые промоторами, описанными выше, и оценивали экспрессию в человеческих культурах клеток сетчатки, происходящих из ES.

Все анализируемые конструкции обеспечивали похожие профили трансдукции в отношении уровней экспрессии GFP и специфичности в отношении колбочковых клеток. Конструкции с меньшими фрагментами промотора обеспечивают больше пространства для упаковки генов большего размера в вектор AAV.

10

### **Пример 2 Оптимизированная TCU обеспечивает сильную экспрессию репортерного гена во всех подтипах колбочек**

Для анализа способности оптимизированных TCU, раскрытых в данном документе, для стимуляции экспрессии репортерного белка в колбочковых клетках, сетчатки человека, происходящие из ES, трансдуцировали, используя AAVshh10-hG1.4.GFP. Во всех подтипах колбочек (Фиг. 3B', C') наблюдали сильную экспрессию репортерного гена (Фиг. 3A).

По сравнению с ранее охарактеризованным человеческим промотором колбочкового аррестина (CAR – от англ. cone arrestin), уровни экспрессии, обеспечиваемые hG1.4, были выше в человеческих колбочках, и отсутствовала эктопическая экспрессия в клетках палочках или клетках пигментного эпителия сетчатки (RPE). У мышей колбочковые промоторы на основе человеческих промоторов красного опсина не являлись специфичными в отношении колбочек и также опосредовали экспрессию в палочках (Ye et al., 2016).

25

### **Пример 3: Дополнительная оптимизация TCU и оптимизация кодонов человеческого гена CNGA3**

Замена последовательности GGGCCG в положениях от +5 до +10 относительно сайта инициации транскрипции гена зеленого опсина на TCTAGA удваивает полученный в результате уровень экспрессии. Данное изменение последовательности (M8), см. SEQ ID NO: 16, таким образом, включали в конструкции hG1.4 и hG1.7.

Кроме того, кодирующую последовательность CNGA3 подвергали оптимизации кодонов для попытки улучшить предпочтение кодонов и CG содержание, и улучшить любые скрытые сайты процессинга и возможные структуры «петля-на-стебле» в мРНК.

Конструкции hG1.4(M8) (SEQ ID NO: 6) и hG1.7(M8) (SEQ ID NO: 15) использовали в векторах AAV2/8, несущих кДНК CNGA3 человека с оптимизированными кодонами (coCNGA3), и определяли эффективность векторов у мышинной модели, накаутированной по CNGA3, с использованием оценок функции колбочек на основе электроретинографии

(ERG). Спустя один месяц после введения вектора, отсутствовало явное преимущество перед вектором без последовательности M8, хотя вектор hG1.7(M8), по-видимому, демонстрировал небольшое улучшение по сравнению с соответствующим вектором без последовательности M8 (Фиг. 4, левые столбики столбца). Когда ERG-оценки у данных животных повторяли через 2 месяца после введения, амплитуды у животных, которым инъецировали векторы «M8», дополнительно увеличивались (Фиг. 4, правые столбики столбца), в то время как амплитуды у животных, которым инъецировали стандартные векторы, оставались постоянными (hG1.4) или увеличивались незначительно (hG1.7). Продемонстрировано, что максимальные уровни экспрессии важны для достижения хорошего восстановления функции при ахроматопсии из-за CNGA3, и данные результаты указывают на то, что включение последовательности M8 в конструкции является полезным для лечения.

Ген CNGA3 с оптимизированными кодонами восстанавливал фотопические ответы у мыши, нокаутированной по *Cnga3*, более эффективно, чем человеческий ген CNGA3 дикого типа (Фиг. 5). Конструкции, несущие промотор красного опсина (1.7L), регулирующий или человеческий ген CNGA3 дикого типа или человеческий ген CNGA3 с оптимизированными кодонами, упаковывали в серотип AAV2/8 и инъецировали субретинально *Cnga3*-дефицитным мышам. Фотопические ERG ответы оценивали через 1 месяц и 2 месяца после инъекции. ERG ответы у животных, получающих вектор с оптимизированными кодонами, были устойчиво выше, чем у животных, получающих ген дикого типа (Фиг. 5).

**Пример 4: Векторы AAV2/8, экспрессирующие CNGA3, могут восстанавливать фотопические ответы у CNGA3-нокаутированной мыши, в то время как соответствующая конструкция AA2/5 обеспечивает минимальное восстановление**

Для оценки способности векторов AAV2/5 и AAV2/8, экспрессирующих CNGA3, восстанавливать фотопические ответы, вирусные векторы AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 и AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3 инъецировали субретинально мышам, нокаутированным по *cnga3*, возраста 1 месяц. Фотопические ERG ответы оценивали через 4 недели после введения. Авторы изобретения наблюдали сильные фотопические ответы в глазах, обработанных AAV2/8, с амплитудами b-волны ERG вплоть до 70 мкВ (Фиг. 6 А и В). Глаза, которые получали субретинальные инъекции в оба полушария (верхнее/нижнее), демонстрировали наибольшее улучшение в амплитуде b-волны ERG. Для сравнения, мышь дикого типа имеет амплитуды около 100-120 мкВ при одних и тех же установках эксперимента. Отсутствовали ответы от необработанных глаз, и глаза, обработанные AAV2/5, обеспечивают минимальные ответы (Фиг. 6 А и В). Эти данные демонстрируют, что вектор AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 способен обеспечить высокие уровни экспрессии

CNGA3 и восстановить функцию колбочек у мышей, нокаутированных по CNGA3, до функции приблизительно 60% дикого типа, как измерено амплитудами b-волны ERG.

Для дополнительной демонстрации того, что восстановление чувствительности сетчатки с помощью векторов AAV2/8, экспрессирующих CNGA3, было длительным, Cnga3-дефицитным мышам в возрасте 2-х недель субретинально инъецировали либо AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n равен 14), либо AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n равен 13) (титр  $1 \times 10^{12}$  вг/мл для обоих), или оставляли необработанными (n равен 3). Обе трансфекции и тем и другим вектором приводят к устойчивому восстановлению чувствительности сетчатки вплоть до шести месяцев после обработки (Фиг. 7).

#### **Пример 5: Векторы AAV2/8, экспрессирующие CNGA3, стимулируют длительную выживаемость колбочек**

Способность векторов AAV2/8, экспрессирующих CNGA3, стимулировать выживаемость колбочек, оценивали посредством инъецирования Cnga3-дефицитной мыши в возрасте 2-х недель AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3. Мышь C57BL/6J в возрасте 3-4 месяца, которая не получала инъекцию, служила в качестве контроля для здоровых колбочек. Сетчатки выделяли и окрашивали колбочковым аррестином и осветляли.

Cnga3-дефицитные сетчатки, трансдуцированные AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (см. Фиг. 8C), демонстрировали выживаемость колбочек *in vivo* 3-4 месяца после обработки. Степень выживаемости была похожа на выживаемость колбочек здорового контроля (см. Фиг. 8A) и значительно повышалась, по сравнению с неинъецированными Cnga3-дефицитными сетчатками (см. Фиг. 8B).

Способность векторов AAV2/8, экспрессирующих CNGA3, стимулировать выживаемость колбочек была длительной и могла еще наблюдаться через 13 месяцев после обработки вектором (см. Фиг. 9).

#### **Пример 6: Векторы AAV2/8, экспрессирующие CNGA3, сохраняют синаптическую связность *in vivo***

Для оценки способности векторов AAV2/8, экспрессирующих CNGA3, улучшать синаптическую целостность между колбочковыми клетками и поддерживающими нейронами (биполярные клетки), Cnga3-дефицитной мыши в возрасте 2-х недель инъецировали AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3. Через 3-4 месяца после обработки сетчатки выделяли и окрашивали Grp179 и PNA и затем очищали. Синаптическую связность определяли посредством измерения интенсивности сигнала маркера синапса Grp179 на конфокальных изображениях в одной плоскости плоских препаратах сетчатки. Программное обеспечение Leica Las X использовали для обработки изображения. Grp179-окрашивания отслеживали, чертя от руки линию на нескольких Grp179-окрашиваниях, связанных с «ножками» колбочек (PNA-окрашивание использовали для

подтверждения «ножек» колбочек) и более чем 10 Gpr179-окрашиваниях, связанных со сферами палочек (A). На выходе получали интенсивность сигнала (B; белая линия: Gpr179, красная линия: PNA). Пики интенсивности сигнала от каждого источника усредняли, и рассчитывали отношение GPr179-окрашивания, связанного с «ножками» колбочек, к GPr179-окрашиванию, связанному со сферами палочек (CP/RS). CP/RS из четырех разных положений использовали для статистического анализа (критерий множественного сравнения Бонферрони (ns: p больше 0,05, \*\*: p меньше или равен 0,01, \*: p меньше или равен 0,05)). Сетчатки от неинъецированной *Cnga3*-дефицитной мыши неинъецированной мыши *C57BL/6J* одного и того же возраста (3-4 месяца) служили в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно.

Как показано на Фиг. 10, трансдукция *Cnga3*-дефицитных сетчаток векторами AAV2/8, экспрессирующими CNGA3, приводит к синаптической связности, похожей на синаптическую связность здоровой мыши контроля и значимо улучшенной, по сравнению с неинъецированными *Cnga3*-дефицитными сетчатками.

**Пример 7: Доставка соCNGA3 с использованием AAV2/8 обеспечивает большую пользу, чем доставка с использованием новых сильных серотипов AAV AAV-Anc80, AAV-44.9 и AAV5**

Целый ряд разных серотипов AAV и капсидов доступен для экспрессии генов. Например, вновь разработанный капсид Anc80-L65, как было показано, обладает эффективным тропизмом в отношении фоторецепторов и сравним или даже превосходит AAV8. Кроме того, также было показано, что новый серотип AAV44.9 демонстрирует эффективную трансдукцию и высокий уровень экспрессии в фоторецепторных клетках при анализе в сочетании с флуоресцентным маркером. Таким образом, сравнивали способность четырех разных векторов AAV – Anc80-L65, AAV44.9, AAV5 и AAV8 – экспрессировать соCNGA3 и обеспечивать устойчивые ERG ответы.

Соответствующие векторы, несущие экспрессионную кассету hG1.4(M8)-соCNGA3 ( $1,0 \times 10^{12}$  вг/мл), доставляли в субретинальное пространство *Cnga3*-дефицитных мышей в возрасте 2-х недель, и фотопическую ERG с одним экстремумом записывали в разные моменты времени после инъекции (см. Фиг. 11). Для анализа использовали световой стимул  $10 \text{ кд/м}^2$ . Как показано на Фиг. 11, AAV8-опосредованный перенос генов приводил к более высоким ERG ответам, по сравнению с Anc80-L65 (см. Фиг. 11A), AAV44.9 (см. Фиг. 11B) или AAV5 (см. Фиг. 11C и Фиг. 6).

**Пример 8: Сравнение оптимизированных TCU с ранее известными, специфичными в отношении колбочек промоторами**

Для сравнения уровня экспрессии TCU, раскрытых в данном документе, с одним из доступных наисильнейших специфичных в отношении колбочек промоторов (1.7L),

человеческие эмбрионидные тельца (hEB) возраста 17-19 недель трансдуцировали AAV-вектором AAVShH10, экспрессирующим eGFP под контролем hG1.4(M8), hG1.7(M8) или P1.7L, соответственно, и собирали, спустя 2 недели (n равен 6-8 для каждого промотора). После диссоциации клетки анализировали в отношении относительной средней интенсивности флуоресценции (MFI) в GFP-позитивных клетках. Относительную MFI в hEB, трансдуцированных разными векторами, оценивали посредством проточной цитометрии и рассчитывали как отношение к MFI в EB, трансдуцированных AAV ShH10-1.7L-eGFP. Как показано на Фиг. 12A, конструкция hG1.7 обеспечивает приблизительно 50%-ное увеличение экспрессии GFP, по сравнению с ранее известным промотором 1.7L.

Кроме того, анализировали вектор AAV2/8 управляющий hCNGA3 от промотора hCAR (человеческий колбочковый аррестин) в мышах, нокаутированных по *CNGA3*. Восстановление фотопических ответов не превышало 30% уровней дикого типа (Фиг. 12B).

Сообщалось, что вектор AAV2/5(Y719F) и мышинный промотор синего колбочкового опсина можно использовать для восстановления *CNGA3*-нокаутированных мышей. В том исследовании фотопические ERG амплитуды достигали 30% от дикого типа при инъекции в P12 и оценивались через 10 недель после обработки (Michalakis et al., 2010). Недавно, вектор AAV5 и промотор красного опсина 2,1 т.п.н. использовали для восстановления *CNGA3*-дефицитной овцы. В данном исследовании происходило удвоение мелькающей ERG колбочек по сравнению с необработанным вариантом (Banin et al, 2015). Однако, оба данных промотора, как известно, функционируют только у части колбочек человека (промотор синего колбочкового опсина является активным только в синих колбочках и промотор красного опсина 2,1 т.п.н. активен только в красных колбочках).

Исследование с использованием вектора AAV2/5 с промотором CBA для экспрессии мышинного *CNGA3* в мышах, нокаутированных по *CNGA3*, проводимое лабораторией Hauswirth, показало восстановление вплоть до 70% от амплитуд b-волны колбочковой ERG, когда мышей обрабатывали очень рано (P14 оценивали через 3 недели после обработки – титр вируса 1E13) (Pang et al., 2012). Авторы изобретения достигли похожей эффективности в восстановлении фотопического зрения при обработке той же животной модели в более позднем возрасте (1 месяц – титр вируса 7E12). В то время как ахроматопсия у человека представляет собой стационарное расстройство, *CNGA3*-мышинная модель страдает от гибели колбочковых клеток в первый месяц, что указывает на то, что более раннее лечение является полезным. Неспецифичный CBA промотор маловероятно будет использоваться в испытании *CNGA3*, но поддерживает точку зрения авторов изобретения, что высокие уровни экспрессии *CNGA3* важны для оптимального восстановления.

## Ссылки

Altschul S. F. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. 1993 J Mol Evol 36:290-300.

Altschul S. F. et al Basic local alignment search tool. 1990 J Mol Biol 215:403-10.

Banin E., Gootwine E., Obolensky A., Ezra-Elia R., Ejzenberg A., Zelinger L., Honig H.,  
5 Rosov A., Yamin E., Sharon D., Averbukh E., Hauswirth W. W., Ofri R. Gene Augmentation  
Therapy Restores Retinal Function and Visual Behavior in a Sheep Model of CNGA3  
Achromatopsia. 2015 Mol Ther. Sep;23(9):1423-33.

Davidoff et al. Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion  
exchange chromatography generates clinical grade vector stock. 2004 J. Virol. Methods 121;  
10 209-215.

Devereux J. et al. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. 1984 Nucleic Acids Research 12, 387-395.

Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J. M. Novel adeno-  
associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc. Natl. Acad.  
15 Sci. USA, 99 (18) (2002), pp. 11854-11859

Hawes N., Wang X., Hurd R. E., Wang J., Davisson M. T., Nusinowitz S., Heckenlively J.  
R., Chang B. A Point Mutation in the *Cnga3* Gene Causes Cone Photoreceptor Function Loss  
(*cpfl5*) in Mice. 2006 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: E-Abstr 4579

Henikoff S. and Henikoff J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks.  
20 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.

Karlin S. and Altschul S. F. Applications and statistics for multiple high-scoring segments  
in molecular sequences. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787.

Michalakis S., Mühlfriedel R., Tanimoto N., Krishnamoorthy V., Koch S., Fischer M. D.,  
Becirovic E., Bai L., Huber G., Beck S. C., Fahl E., Büning H., Paquet-Durand F., Zong X.,  
25 Gollisch T., Biel M., Seeliger M. W. Restoration of cone vision in the CNGA3-/- mouse model of  
congenital complete lack of cone photoreceptor function. 2010 Mol Ther. Dec;18(12):2057-63.

Pang J. J., Deng W. T., Dai X., Lei B., Everhart D., Umino Y., Li J., Zhang K., Mao S.,  
Boye S. L., Liu L., Chiodo V. A., Liu X., Shi W., Tao Y., Chang B., Hauswirth W. W. AAV-  
mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-Achromatopsia. 2012  
30 PLoS One. 7(4):e35250.

Shabaan S. A. and Deeb S. S. Functional Analysis of the Promoters of the Human Red  
and Green Visual Pigment Genes. 1998 IOVS 39: 885-896.

Smallwood P. M., Wang Y., Nathans J. Role of a Locus Control Region in the mutually  
exclusive expression of human red and green cone pigment genes. 2002 Proc Natl Acad Sci U  
35 S A. Jan 22;99(2):1008-11.

Ye G. J., Budzynski E., Sonnentag P., Nork T. M., Sheibani N., Gurel Z., Boye S. L.,  
Peterson J. J., Boye S. E., Hauswirth W. W., Chulay J. D. Cone-Specific Promoters for Gene  
Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. 2016 Hum Gene Ther. Jan;27(1):72-82.

**Информация о последовательностях**

SEQ ID NO: 1 – 1,2 т.п.н. фрагмент локус-контролирующей области (LCR) M/L  
опсина

5 TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTG  
TTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTG  
ACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCAC  
GATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCAAATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGC  
CATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAAT  
10 CGGCTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAACATCTAAT  
CTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGGCAGAGCA  
GAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGCCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGC  
CCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCAC  
CCCCTCACCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTC  
15 TGCAAGAGTGTGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCAC  
AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCT  
GTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCCTTTCCAG  
GCCTCCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGT  
GTGGCCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAG  
20 GGCAGACAGGGCGAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCC  
CCAGACACCCCACTCCTCCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA  
GGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTC  
CCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTGCGCCTGTTCAAGGCCACC  
CAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGA  
25 CCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTG

SEQ ID NO: 2 - фрагмент M опсинового промотора, размером 2,0 т.п.н., подчеркнут  
фрагмент SEQ ID NO: 3, размером 500 п.н., UTR курсивом без последовательности M8

TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTACTCAG  
30 GATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCAGCAAGTAGAGGCTGCAGTGACCTGTGACT  
GTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGACCTTGTCTCAAAAAAAAAAAGAGCG  
GGGGGGGGGGCCGGGCCGGGCGTGGTGGCTCACAGCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA  
AGCCAAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCATCATGGTCAACACTGCG  
AAACACTGTCCCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACACCTGTAATC  
35 CCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGAGACGGAGGTTGCA  
GTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACTGACAAGAGTGAGATTGTCTCAA  
AAAAAAAAAAAAAGTAATCACTAGAAAAGAAGCTACATATGTACATAACATCCAAATAACCA  
GAGGAGAAAAAATGGGACTTGATTAATCAAAACAAAAACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGGG

GGAGAAAATAAAACAAGGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGA  
 AGCCAAGGTGGGTGGATCTCTTGAGCTCAGGAGGTCAAGACCAGCCTGGGCAACATGGC  
 GAAACCCCGTCTCTATTAATAAAAAAAAAATTAATACAACAATTATCCTGGAGTGGTGGTGCACA  
 CCTGTAGTCCCAGCTACCCAGGACGCTGAGACGGGAGGATCGCTTGATCCCGGGGATGT  
 5 CGAGGCTGCCGTGATCGCACCACTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCCATC  
 TCAAAAAATAAATAAATAAAAGCAAACAAGAAAAAAAAAAGGCTTGAAACATATCTGATAGATA  
 AAGGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAAATCAGTAACTAAGAGCAAATAACCCA  
 ATATAAAGACATTAAGGGTAGCCACGGACATCTCAGACGACGAAAAACAAAAGACAGTAA  
 ACGTATAATAAAACATGTAATTGCAAGGTGATCCGGGAATAGTAAGCGAAAAGCAACAATTA  
 10 AATACTATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTA AAAAGCCTAACAAATGTCCAGGGCTG  
 GCGAGAATGTGGCAGAAGGTGATGTCACATACCCTGCAAGTGGGAATCTAACAGATTCA  
 GGGTTTTGGTTTTTTTTTAATCGCAATTAGGTGGCCTGTTAAATTTTTTTTTCTTGAGACAGAG  
 TTTTGCTCTTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCAATGGCTCGATCTTGGCTCACCGCAACCTCGA  
 CCTCCCAGGTACAAGCGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAGTACAGGTATT  
 15 TGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTTACCATGTTAGTCA  
GGCTGGTCGGGAACTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGG  
GATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTG  
CCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGATTCA  
AGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCT  
 20 GAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGT  
CTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAA  
GAGGCCCGGGCTGATCCCCTGACCCTGATCCCGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGCACC  
AGGGCCGGCTGCCGTCCGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

25 SEQ ID NO: 3 – фрагмент М опсина, размером 500 п.н., UTR курсивом, подчеркнута мутация М8

ACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTT  
 CACCATGTTAGTCAGGCTGGTCGGGAACTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCC  
 TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGA  
 30 GTCTTGGTCTGTTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCC  
 GCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTC  
 CAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGT  
 GGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGA  
 GCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGACCCTGATCCCGGTATAAAGCACCGTGACCCT  
 35 CAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCCGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

SEQ ID NO: 4 – вариант конструкции hG1.7(M8), 1,2 т.п.н. фрагмент LCR M/L опсина, фрагмент М опсина, размером 500 п.н., UTR курсивом, подчеркнута мутация М8

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTG  
 TTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTG  
 ACTGGACTATACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCAC  
 GATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCAAATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGC  
 5 CATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAAT  
 CGGCTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAACATCTAAT  
 CTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGGCAGAGCA  
 GAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGC  
 CCTCTTTCTTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCAC  
 10 CCCCTCACCCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTC  
 TGCAAGAGTGTGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCAC  
 AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCT  
 GTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCCTTTCCAG  
 GCCTCCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGT  
 15 GTGGCCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAG  
 GGCAGACAGGGCGAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCC  
 CCAGACACCCCCTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA  
 GGGCTTCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTC  
 CCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTGCGCCTGTTCAAGGCCACC  
 20 CAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGA  
 CCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGACAGGT  
 ATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTTAG  
 TCAGGCTGGTTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCTTGGCCTCCCAAAGTGC  
 TGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTG  
 25 TTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGAT  
 TCAAGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCC  
 TCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGA  
 GGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGT  
 GAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGACCCTGACCGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGC  
 30 ACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

SEQ ID NO: 5 – фрагмент М опсина 200 п.н., UTR курсивом, подчеркнута мутация М8

GATCGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTC  
 35 AGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGA  
 TCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGAC  
 CGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAG  
GGCTTTCCATAGCC

SEQ ID NO: 6 - конструкция hG1.4(M8): фрагмент LCR M/L опсина, размером 1,2 т.п.н., фрагмент М опсина 200 п.н., UTR курсивом, подчеркнутая мутация М8

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGAAAGGGGCATGGGTG  
 5 TTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTG  
 ACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCAC  
 GATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCAAATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGC  
 CATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAAT  
 CGGCTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAACATCTAAT  
 10 CTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGGCAGAGCA  
 GAGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGGCCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGC  
 CCTCTTTCTTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCAC  
 CCCCTACCCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTC  
 TGCAAGAGTGTGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCAC  
 15 AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCT  
 GTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCCTTTCCAG  
 GCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGT  
 GTGGCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCAATTAGCGTAATCCTGGACAAG  
 GGCAGACAGGGCGAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCC  
 20 CCAGACACCCCCTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA  
 GGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTC  
 CCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTGCGCCTGTTCAAGGCCACC  
 CAGCCAGCTCATGGCGTAATGGGACAAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGA  
 CCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGGATCGA  
 25 TTACAGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGA  
 AGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTA  
 GGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAGCA  
 CCGTGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGC  
 C

30

SEQ ID NO: 7- кДНК CNGA3 без оптимизации кодонов

ATGGCCAAGATCAACACCCAATACTCCCACCCCTCCAGGACCCACCTCAAGGTA  
 GACCTCAGACCGAGATCTCAATCGCGCTGAAAATGGCCTCAGCAGAGCCCACTCGTCAAG  
 TGAGGAGACATCGTCAGTGCTGCAGCCGGGGATCGCCATGGAGACCAGAGGACTGGCTG  
 35 ACTCCGGGCAGGGCTCCTTACCCGGCCAGGGGATCGCCAGGCTGTGCGCCTCATCTTC  
 TTGCTGCGCAGGTGGGCTGCCAGGCATGTGCACCACCAGGACCAGGGACCGGACTCTTT  
 TCCTGATCGTTTCCGTGGAGCCGAGCTTAAGGAGGTGTCCAGCCAAGAAAGCAATGCCCA  
 GGCAAATGTGGGCAGCCAGGAGCCAGCAGACAGAGGGAGAAGCGCCTGGCCCCTGGCC

AAATGCAACACTAACACCAGCAACAACACGGAGGAGGAGAAGAAGACGAAAAAGAAGGAT  
 GCGATCGTGGTGGACCCGTCCAGCAACCTGTACTACCGCTGGCTGACCGCCATCGCCCT  
 GCCTGTCTTCTATAACTGGTATCTGCTTATTTGCAGGGCCTGTTTCGATGAGCTGCAGTCC  
 GAGTACCTGATGCTGTGGCTGGTCCTGGACTACTCGGCAGATGTCCTGTATGTCTTGGAT  
 5 GTGCTTGTACGAGCTCGGACAGGTTTTCTCGAGCAAGGCTTAATGGTCAGTGATACCAACA  
 GGCTGTGGCAGCATTACAAGACGACCACGCAGTTCAAGCTGGATGTGTTGTCCCTGGTCC  
 CCACCGACCTGGCTTACTTAAAGGTGGGCACAACTACCCAGAAGTGAGGTTCAACCGCC  
 TACTGAAGTTTTCCCGGCTCTTTGAATTCTTTGACCGCACAGAGACAAGGACCAACTACCC  
 CAATATGTTTCAGGATTGGGAACCTTGGTCTTGTACATTCTCATCATCATCCACTGGAATGCCT  
 10 GCATCTACTTTGCCATTTCCAAGTTCATTGGTTTTGGGACAGACTCCTGGGTCTACCCAAAC  
 ATCTCAATCCCAGAGCATGGGCGCCTCTCCAGGAAGTACATTTACAGTCTCTACTGGTCCA  
 CCTTGACCCTTACCACCATTGGTGAGACCCACCCCCCGTGAAAGATGAGGAGTATCTCTT  
 TGTGGTCGTAGACTTCTTGGTGGGTGTTCTGATTTTTGCCACCATTGTGGGCAATGTGGGC  
 TCCATGATCTCGAATATGAATGCCTCACGGGCAGAGTTCAGGCCAAGATTGATTCCATCA  
 15 AGCAGTACATGCAGTTCGCAAGGTCACCAAGGACTTGGAGACGCGGGTTATCCGGTGGT  
 TTGACTACCTGTGGGCCAACAGAAGACGGTGGATGAGAAGGAGGTGCTCAAGAGCCTCC  
 CAGACAAGCTGAAGGCTGAGATCGCCATCAACGTGCACCTGGACACGCTGAAGAAGGTTT  
 GCATCTTCCAGGACTGTGAGGCAGGGCTGCTGGTGGAGCTGGTGTGAAAGCTGCGACCC  
 ACTGTGTTTCAGCCCTGGGGATTATATCTGCAAGAAGGGAGATATTGGGAAGGAGATGTACA  
 20 TCATCAACGAGGGCAAGCTGGCCGTGGTGGCTGATGATGGGGTCACCCAGTTCGTGGTC  
 CTCAGCGATGGCAGCTACTTCGGGGAGATCAGCATTCTGAACATCAAGGGGAGCAAGTCG  
 GGAACCGCAGGACGGCCAACATCCGCAGCATTGGCTACTCAGACCTGTTCTGCCTCTCA  
 AAGGACGATCTCATGGAGGCCCTCACCGAGTACCCGAAGCCAAGAAGGCCCTGGAGGA  
 GAAAGGACGGCAGATCCTGATGAAAGACAACCTGATCGATGAGGAGCTGGCCAGGGCGG  
 25 GCGCGGACCCCAAGGACCTTGAGGAGAAAGTGGAGCAGCTGGGGTCTCCCTGGACACC  
 CTGCAGACCAGGTTTGCACGCCTCCTGGCTGAGTACAACGCCACCCAGATGAAGATGAAG  
 CAGCGTCTCAGCCAACCTGGAAAGCCAGGTGAAGGGTGGTGGGGACAAGCCCTGGCTGA  
 TGGGGAAGTTCCCGGGGATGCTACAAAACAGAGGACAAACAACAGTGA

30 SEQ ID NO: 8 - κДНК *CNGA3* с оптимизированными кодонами

ATGGCAAAAATCAATACCCAGTACAGCCACCCCTCACGAACTCACCTGAAAGTCAA  
 AACAAAGCGATAGAGACCTGAACAGAGCCGAGAACGGCCTGTCCAGGGCCCACAGCTCCT  
 CTGAGGAAACTAGTTCAGTGCTGCAGCCTGGAATCGCTATGGAGACCAGAGGGCTGGCTG  
 ACTCTGGCCAAGGAAGTTTTACAGGGCAGGGCATCGCCAGGCTGTCTAGACTGATTTTTCT  
 35 GCTGAGGAGATGGGCCGCTAGGCATGTGCACCATCAGGACCAGGGACCCGATAGTTTCC  
 CTGACAGGTTTCAGGGGGGCCGAACTGAAGGAGGTCAGCTCCCAGGAATCTAACGCACAG  
 GCCAATGTGGGCAGTCAGGAGCCCGCTGATAGAGGACGGTCCGCATGGCCTCTGGCCAA  
 GTGCAACACTAATACCTCTAACAATACAGAGGAAGAGAAGAAAATAAGAAAAAGGATGCC

ATCGTGGTTCGACCCTTCTAGTAACCTGTACTATAGGTGGCTGACAGCTATCGCACTGCCAG  
 TGTTCTACAATTGGTATCTGCTGATTTGCAGAGCTTGTTTTGACGAACTGCAGAGTGAGTAT  
 CTGATGCTGTGGCTGGTGGCTGGATTACTCAGCAGACGTGCTGTATGTGCTGGATGTCCTG  
 GTGCGCGCACGAACTGGGTTCCCTGGAGCAGGGCCTGATGGTGAGCGACACCAACAGACT  
 5 GTGGCAGCACTACAAAACCACAACCTCAGTTTAAGCTGGATGTCCTGTCCCTGGTGCCAACC  
 GACCTGGCCTACCTGAAAGTCGGCACAACTATCCCGAGGTGCGGTTCAATCGCCTGCTG  
 AAGTTCTCTCGGCTGTTTGAGTTCTTCGATAGGACAGAGACTAGAACCAACTACCCAAATAT  
 G

TTCCGCATCGGCAACCTGGTGGCTGTATATTCTGATCATTATCCACTGGAATGCTTGTATCTA  
 10 CTTTGCAATCAGCAAGTTCATTGGATTTGGGACCGACAGCTGGGTGTATCCAAACATTTCC  
 ATCCCCGAACATGGACGACTGAGCAGGAAGTACATCTATTCACTGTACTGGAGCACACTGA  
 CTCTGACCACAATTGGGGAGACCCCCCTCCAGTGAAGGATGAAGAGTACCTGTTTCGTGG  
 TCGTGGACTTTCTGGTTCGGCGTGCTGATCTTCGCAACAATTGTCGGCAATGTGGGAAGTAT  
 GATCTCAAACATGAATGCCTCACGAGCTGAGTTCAGGCTAAAATTGACAGCATCAAGCAG  
 15 TATATGCAGTTTAGAAAAGTCACTAAGGATCTGGAGACCAGAGTGATCCGGTGGTTTGACT  
 ACCTGTGGGCCAACAAAAAGACAGTCGATGAAAAAGAGGTGCTGAAGAGCCTGCCCGACA  
 AACTGAAGGCAGAGATTGCCATCAATGTCCATCTGGATACTCTGAAAAAGGTGCGGATCTT  
 CCAGGACTGCGAAGCAGGACTGCTGGTCGAGCTGGTGGTGAAGCTGCGCCCTACCGTGT  
 TTAGCCCAGGCGATTATATCTGTAAAAAGGGGGACATTGGCAAAGAAATGTACATTATCAA  
 20 CGAGGGGAAGCTGGCTGTCGTGGCAGACGATGGCGTGACCCAGTTCGTGCTGCTGAGCG  
 ATGGCAGCTATTTTGGGGAAATTTCCATCCTGAATATCAAAGGCTCCAAGTCTGGAAACCG  
 GCGCACAGCTAATATTCGGTCCATCGGATATTCTGACCTGTTCTGCCTGTCTAAGGACGAT  
 CTGATGGAGGCACTGACTGAATACCCCGAGGCCAAAAGGCTCTGGAAGAGAAAGGCCG  
 GCAGATCCTGATGAAGGATAACCTGATTGACGAAGAGCTGGCACGAGCTGGAGCAGACCC  
 25 TAAAGATCTGGAAGAGAAGGTGGAGCAGCTGGGATCAAGCCTGGATACCCTGCAGACACG  
 CTTGCTCGACTGCTGGCAGAATACAATGCCACCCAGATGAAAATGAAGCAGCGCCTGAG  
 TCAGCTGGAGTCACAGGTGAAAGGCGGAGGGGACAAGCCCTGGCAGATGGCGAAGTCC  
 CTGGCGACGCTACAAAACAGAAGATAAACAGCAGTAA

30 SEQ ID NO: 9 – κДНК *PDE6C*, NM\_006204.3

ATGGGTGAGATCAACCAAGTTGCCGTGGAGAAATACCTGGAGGAGAACCCTCAGTT  
 TGCCAAGGAGTACTTTGACAGGAAGTTGCGGGTGGAGGTGCTGGGAGAAATCTTCAAGAA  
 CAGCCAGGTGCCAGTCCAGTCCAGCATGTCCTTCTCTGAGCTGACCCAGGTGGAGGAGTC  
 AGCCCTGTGCTTGGAGCTGCTGTGGACCGTGCAGGAGGAGGGGGGCACCCAGAGCAG  
 35 GGGGTTACAGGGCCCTGCAGAGGCTGGCCACCTGCTCCAGGCTGACCGCTGCAGCAT  
 GTTCCTGTGCCGGTCCCGGAACGGCATACTGAGGTGGCCTCTAGGTTGCTGGATGTCAC  
 CCCCACCTCCAAGTTTGAGGACAACCTGGTGGGCCCTGACAAAGAAGTTGTGTTTCCATTG  
 GACATTGGGATAGTGGGTTGGGCTGCTCACACGAAGAAAACCTATAATGTCCCAGATGTGA



ATGAGTGACAACACTACTCTGCCTGCTCCAGCTTCAAACCAGGGTCTACCACCCC  
 ACGCAAAGGCCCTCCCAAGTTCAAGCAGAGGCAGACTCGCCAATTCAAGAGTAAACCTCC  
 AAAGAAAGGTGTGAAAGGATTTGGAGATGACATTCCAGGAATGGAGGGGCTAGGAACAGA  
 TATCACAGTGATTTGTCCATGGGAGGCATTCAGCCACCTGGAATTGCATGAGCTCGCTCAG  
 5 TTTGGGATTATCTGA

SEQ ID NO: 11 – κДНК *GNAT2*, NM\_005272.3

ATGGGAAGTGGAGCCAGTGCTGAGGACAAAGAACTGGCCAAGAGGTCCAAGGAGC  
 TAGAAAAGAAGCTGCAGGAGGATGCTGATAAGGAAGCCAAGACTGTCAAGCTGCTACTGC  
 10 TGGGTGCTGGGGAGTCAGGAAAGAGCACCATCGTCAAACAGATGAAGATCATTACCAGG  
 ATGGCTATTCACCAGAAGAATGCCTGGAGTTC AAGGCTATCATCTATGGAAATGTGCTGCA  
 GTCCATCCTGGCTATCATCCGGGCCATGACCACACTGGGCATCGATTATGCTGAACCAAG  
 CTGTGCGGATGACGGGCGACAGCTCAACAACCTGGCTGACTCCATTGAGGAGGGAACCAT  
 GCCTCCTGAGCTCGTGGAGGTCATTAGGAGGTTGTGGAAGGATGGTGGGGTGCAAGCCT  
 15 GCTTCGAGAGAGCTGCAGAATACCAGCTTAATGACTCCGCATCTTACTACCTGAACCAATT  
 AGAACGAATTACAGACCCTGAGTACCTCCCTAGTGAGCAAGATGTGCTCCGATCCAGAGTC  
 AAAACCACGGGCATCATTGAAACCAAGTTTTCCGTCAAAGACTTGAATTTACAGGATGTTTGA  
 TGTGGGAGGGCAGAGATCCGAGAGAAAGAAGTGGATCCACTGCTTCGAGGGAGTCACCT  
 GCATCATTTTCTGTGCAGCCCTCAGTGCCTATGATATGGTGCTGGTGGGAAGATGACGAAGT  
 20 GAATCGTATGCATGAGTCTTTGCATCTGTTCAACAGCATATGTAACCACAAATTCTTTGCGG  
 CTA CTTCATTGTCCTCTTTCTCAACAAGAAGGACCTCTTTGAGGAAAAAATCAAGAAAGTC  
 CATCTCAGCATTTGTTTTCCAGAGTATGATGGTAACAACCTCCTATGATGATGCGGGGAATTA  
 CATAAAGAGCCAGTTCCTTGACCTCAATATGCGAAAAGATGTCAAAGAAATCTACAGTCACA  
 TGACCTGTGCTACAGATACACAGAATGTCAAATTTGTGTTTGATGCAGTTACAGATATTATC  
 25 ATCAAAGAAAACCTCAAGGACTGCGGCCTCTTCTAA

SEQ ID NO: 12 – κДНК *KCNV2*, NM\_133497.3

ATGCTCAAACAGAGTGAGAGGAGACGGTCCCTGGAGCTACAGGCCCTGGAACACGA  
 CGGAGAATGAGGGCAGCCAACACCGCAGGAGCATTTGCTCCCTGGGTGCCCGTTCCGGC  
 30 TCCCAGGCCAGCATCCACGGCTGGACAGAGGGCAACTATAACTACTACATCGAGGAAGAC  
 GAAGACGGCGAGGAGGAGGACCAGTGAAGGACGACCTGGCAGAAGAGGACCAGCAGG  
 CAGGGGAGGTCACCACCGCCAAGCCCGAGGGCCCCAGCGACCCTCCGGCCCTGCTGTC  
 CACGCTGAATGTGAACGTGGGTGGCCACAGCTACCAGCTGGACTACTGCGAGCTGGCCG  
 GCTTCCCCAAGACGCGCCTAGGTCGCCTGGCCACCTCCACCAGCCGCAGCCGCCAGCTA  
 35 AGCCTGTGCGACGACTACGAGGAGCAGACAGACGAATACTTCTTCGACCGCGACCCGGC  
 CGTCTTCCAGCTGGTCTACAATTTCTACCTGTCCGGGGTGCTGCTGGTGTGCTCGACGGGCT  
 GTGTCCGCGCCGCTTCCTGGAGGAGCTGGGCTACTGGGGCGTGCGGCTCAAGTACACGC  
 CACGCTGCTGCCGCATCTGCTTCGAGGAGCGGCGCGACGAGCTGAGCGAACGGCTCAAG

ATCCAGCACGAGCTGCGCGCGCAGGCCGAGGTTCGAGGAGGCGGAGGAACTCTTCCGCG  
 ACATGCGCTTCTACGGCCCCGAGCGGCGCCGCCTCTGGAACCTCATGGAGAAGCCATTCT  
 CCTCGGTGGCCGCCAAGGCCATCGGGGTGGCCTCCAGCACCTTCGTGCTCGTCTCCGTG  
 GTGGCGCTGGCGCTCAACACCGTGGAGGAGATGCAGCAGCACTCGGGGCAGGGCGAGG  
 5 GCGGCCCAGACCTGCGGCCCATCCTGGAGCACGTGGAGATGCTGTGCATGGGCTTCTTC  
 ACGCTCGAGTACCTGCTGCGCCTAGCCTCCACGCCCGACCTGAGGCGCTTCGCGCGCAG  
 CGCCCTCAACCTGGTGGACCTGGTGGCCATCCTGCCGCTCTACCTTCAGCTGCTGCTCGA  
 GTGCTTCACGGGCGAGGGCCACCAACGCGGCCAGACGGTGGGCAGCGTGGGTAAGGTG  
 GGTCAGGTGTTGCGCGTCATGCGCCTCATGCGCATCTTCCGCATCCTCAAGCTGGCGCGC  
 10 CACTCCACCGGACTGCGTGCCTTCGGCTTCACGCTGCGCCAGTGCTACCAGCAGGTGGG  
 CTGCCTGCTGCTCTTCATCGCCATGGGCATCTTCACTTTCTCTGCGGCTGTCTACTCTGTG  
 GAGCACGATGTGCCCAGCACCAACTTCACTACCATCCCCACTCCTGGTGGTGGGCCGCG  
 GTGAGCATCTCCACCGTGGGCTACGGAGACATGTACCCAGAGACCCACCTGGGCAGGTTT  
 TTTGCCTTCTCTGCATTGCTTTTGGGATCATTCTCAACGGGATGCCCATTTCCATCCTCTA  
 15 CAACAAGTTTTCTGATTACTACAGCAAGCTGAAGGCTTATGAGTATACCACCATACGCAGG  
 GAGAGGGGAGAGGTGAACTTCATGCAGAGAGCCAGAAAGAAGATAGCTGAGTGTTTGCTT  
 GGAAGCAACCCACAGCTCACCCCAAGACAAGAGAATTAG

SEQ ID NO: 13 – κДНК *CACNA2D4*, NM\_172364.4

20 ATGGTCTGTGGCTGCTCTGCCCTCCTTCCCCTCCCCAACCCACCCAGGCCACCATGC  
 CTGCAACTCCCAACTTCCTCGCAAACCCAGCTCCAGCAGCCGCTGGATTCCCCTCCAGC  
 CAATGCCCGTGGCCTGGGCCTTTGTGCAGAAGACCTCGGCCCTCCTGTGGCTGCTGCTTC  
 TAGGCACCTCCCTGTCCCCTGCGTGGGGACAGGCCAAGATTCTCTGGAAACAGTGAAGC  
 TATGGGCTGACACCTTCGGCGGGGACCTGTATAAACTGTGACCAAATACTCAGGCTCTCT  
 25 CTTGCTGCAGAAGAAGTACAAGGATGTGGAGTCCAGTCTGAAGATCGAGGAGGTGGATGG  
 CTTGGAGCTGGTGAAGGAAATTCTCAGAGGACATGGAGAACATGCTGCGGAGGAAAGTCGA  
 GGCGGTCCAGAATCTGGTGAAGCTGCCGAGGAGGCCGACCTGAACCACGAATTC AATG  
 AATCCCTGGTGTTCGACTATTACAACCTCGGTCCTGATCAACGAGAGGGACGAGAAGGGCA  
 ACTTCGTGGAGCTGGGCGCCGAGTTCCTCCTGGAGTCCAATGCTCACTTCAGCAACCTGC  
 30 CGGTGAACACCTCCATCAGCAGCGTGCAGCTGCCACCAACGTGTACAACAAAGACCCAG  
 ATATTTTAAATGGAGTCTACATGTCTGAAGCCTTGAATGCTGTCTTCGTGGAGAACTTCCAG  
 AGAGACCCAACGTTGACCTGGCAATATTTTGGCAGTGCAACTGGATTCTTCAGGATCTATC  
 CAGGTATAAAATGGACACCTGATGAGAATGGAGTCATTACTTTTACTGCCGAAACCGCGG  
 CTGGTACATTCAAGCTGCTACTTCTCCCAAGGACATAGTGATTTTGGTGGACGTGAGCGGC  
 35 AGTATGAAGGGGCTGAGGATGACTATTGCCAAGCACACCATCACCACCATCTTGGACACC  
 CTGGGGGAGAATGACTTCATTAATATCATAGCGTACAATGACTACGTCCATTACATCGAGC  
 CTTGTTTTAAAGGGATCCTCGTCCAGGCGGACCCGAGACAATCGAGAGCATTTCAAACCTGCT  
 GGTGGAGGAGTTGATGGTCAAAGGTGTGGGGGTCGTGGACCAAGCCCTGAGAGAAGCCT

TCCAGATCCTGAAGCAGTTCCAAGAGGCCAAGCAAGGAAGCCTCTGCAACCAGGCCATCA  
TGCTCATCAGCGACGGCGCCGTGGAGGACTACGAGCCGGTGTGTTGAGAAGTATAACTGGC  
CAGACTGTAAGGTCCGAGTTTTCACTTACCTCATTGGGAGAGAAGTGTCTTTTGCTGACCG  
CATGAAGTGGATTGCATGCAACAACAAAGGCTACTACACGCAGATCTCAACGCTGGCGGA  
5 CACCCAGGAGAACGTGATGGAATACCTGCACGTGCTCAGCCGCCCCATGGTCATCAACCA  
CGACCACGACATCATCTGGACAGAGGCCTACATGGACAGCAAGCTCCTCAGCTCGCAGGC  
TCAGAGCCTGACACTGCTCACCCTGTGGCCATGCCAGTCTTCAGCAAGAAGAACGAAAC  
GCGATCCCATGGCATTCTCCTGGGTGTGGTGGGCTCAGATGTGGCCCTGAGAGAGCTGAT  
GAAGCTGGCGCCCCGGTACAAGCTTGGAGTGCACGGATACGCCTTTCTGAACACCAACAA  
10 TGGCTACATCCTCTCCCATCCCGACCTCCGGCCCCCTGTACAGAGAGGGGAAGAACTAAA  
ACCCAAACCTAACTACAACAGTGTGGATCTCTCCGAAGTGGAGTGGGAAGACCAGGCTGA  
ATCTCTGAGAACAGCCATGATCAATAGGGAAACAGGTACTCTCTCGATGGATGTGAAGGTT  
CCGATGGATAAAGGGAAGCGAGTTCTTTTCTGACCAATGACTACTTCTTCACGGACATCA  
GCGACACCCCTTTCAGTTTGGGGGTGGTGTGTCCCGGGGCCACGGAGAATACATCCTTC  
15 TGGGGAACACGTCTGTGGAAGAAGGCCTGCATGACTTGCTTCACCCAGACCTGGCCCTGG  
CCGGTACTGGATCTACTGCATCACAGATATTGACCCAGACCACCGGAAGCTCAGCCAGC  
TAGAGGCCATGATCCGCTTCTCACCAGGAAGGACCCAGACCTGGAGTGTGACGAGGAG  
CTGGTCCGGGAGGTGCTGTTTGACGCGGTGGTGTGACAGCCCCCATGGAAGCCTACTGGAC  
AGCGCTGGCCCTCAACATGTCCGAGGAGTCTGAACACGTGGTGGACATGGCCTTCTGGG  
20 CACCCGGGCTGGCCTCCTGAGAAGCAGCTTGTTTCGTGGGCTCCGAGAAGGTCTCCGACA  
GGAAGTTCCTGACACCTGAGGACGAGGCCAGCGTGTTCACCCTGGACCGCTTCCCGCTGT  
GGTACCGCCAGGCCTCAGAGCATCCTGCTGGCAGCTTCGTCTTCAACCTCCGCTGGGCAG  
AAGGACCAGAAAGTGCGGGTGAACCCATGGTGGTGTGACGGCAAGCACAGCTGTGGCGGTG  
ACCGTGGACAAGAGGACAGCCATTGCTGCAGCCGCGGGCGTCCAAATGAAGCTGGAATTC  
25 CTCCAGCGCAAATTCTGGGCGGCAACGCGGCAGTGCAGCACTGTGGATGGGCCGTGCAC  
ACAGAGCTGCGAGGACAGTGTCTGGACTGCTTCGTCATCGACAACAACGGGTTTATTCT  
GATCTCCAAGAGGTCCCGAGAGACGGGAAGATTTCTGGGGGAGGTGGATGGTGTGTCC  
TGACCCAGCTGCTCAGCATGGGGGTGTTTCAGCCAAGTACTATGTATGACTATCAGGCCA  
TGTGCAAACCCCTCGAGTCACCACCACAGTGCAGCCCAGCCCCTGGTCAGCCCAATTTCTG  
30 CTTCTTGACGGCGACCAGGTGGCTGCTGCAGGAGCTGGTGTGTTTCTGCTGGAGTGG  
AGTGTCTGGGGCTCCTGGTACGACAGAGGGGCCGAGGCCAAAAGTGTCTTCCATCACTCC  
CACAAACACAAGAAGCAGGACCCGCTGCAGCCCTGCGACACGGAGTACCCCGTGTTCGT  
GTACCAGCCGGCCATCCGGGAGGCCAACGGGATCGTGGAGTGCGGGCCCTGCCAGAAG  
GTATTTGTGGTGCAGCAGATTCCCAACAGTAACCTCCTCCTCCTGGTGTGACAGACCCACCT  
35 GTGACTGCAGCATCTTCCCACCAGTGTGCTGCAGGAGGCCGACAGAAGTCAAATATAATGCCT  
CTGTCAAATGTGACCGGATGCGCTCCAGAAAGCTCCGCCGGCGACCAGACTCCTGCCAC  
GCCTTCCATCCAGAGGAGAATGCCAGGACTGCGGGCGGCCTCGGACACCTCAGCCTC

GCCGCCCTACTCCTGCTGCCTGTGTGTGCCTGGGGGCTACTGCCCCAACCTCCTGCGGT  
GA

SEQ ID NO: 14 – κДНК *CNGB3*, NM\_019098.4

5 ATGTTTAAATCGCTGACAAAAGTCAACAAGGTGAAGCCTATAGGAGAGAACAATGA  
GAATGAACAAAGTTCTCGTCGGAATGAAGAAGGCTCTCACCCAAGTAATCAGTCTCAGCAA  
ACCACAGCACAGGAAGAAAACAAGGTGAAGAGAAATCTCTCAAACCAAGTCAACTCCAG  
TCACGTCTGAAGAGCCACACACCAACATACAAGACAAACTCTCCAAGAAAAATTCTCTGG  
AGATCTGACCACAAACCCTGACCCTCAAATGCAGCAGAACCAACTGGAACAGTGCCAGA  
10 GCAGAAGGAAATGGACCCCGGGAAGAAGGTCCAACAGCCCACAAAACAACCCGCCTGC  
AGCTCCTGTTATAAATGAGTATGCCGATGCCAGCTACACAACCTGGTGAAAAGAATGCGT  
CAAAGAACAGCCCTCTACAAGAAAAAGTTGGTAGAGGGAGATCTCTCCTCACCCGAAGCC  
AGCCCACAAACTGCAAAGCCCACGGCTGTACCACCAGTAAAAGAAAGCGATGATAAGCCA  
ACAGAACATTACTACAGGCTGTTGTGGTTCAAAGTCAAAAAGATGCCTTTAACAGAGTACTT  
15 AAAGCGAATTAACCTTCCAAACAGCATAGATTCATACACAGATCGACTCTATCTCCTGTGGC  
TCTTGCTTGTCACTCTTGCCCTATAACTGGAAGTCTGGTTTATACCACTGCGCCTCGTCTTC  
CCATATCAAACCGCAGACAACATACTACTGGCTTATTGCGGACATCATATGTGATATCAT  
CTACCTTTATGATATGCTATTTATCCAGCCCAGACTCCAGTTTGTAAGAGGAGGAGACATAA  
TAGTGGATTCAAATGAGCTAAGGAAACACTACAGGACTTCTCCAAAATTTTCAGTTGGATGTC  
20 GCATCAATAATACCATTTGATATTTGCTACCTCTTCTTTGGGTTTAAATCCAATGTTTAGAGCA  
AATAGGATGTTAAAGTACACTTCATTTTTTGAATTTAATCATCACCTAGAGTCTATAATGGAC  
AAAGCATATATCTACAGAGTTATTCGAACAACCTGGATACTTGCTGTTTATTCTGCACATTAAT  
GCCTGTGTTTATTACTGGGCTTCAAACCTATGAAGGAATTGGCACTACTAGATGGGTGTATG  
ATGGGGAAGGAAACGAGTATCTGAGATGTTATTATTGGGCAGTTCGAACTTTAATTACCATT  
25 GGTGGCCTACCAGAACCACAAACTTTATTTGAAATTGTTTTTCAACTCTTGAATTTTTTTTCT  
GGAGTTTTTGTGTTCTCCAGTTTAAATTGGTCAGATGAGAGATGTGATTGGAGCAGCTACAG  
CCAATCAGAACTACTTCCGCGCCTGCATGGATGACACCATTGCCTACATGAACAATTACTC  
CATTCTAACTTGTGCAAAGCGAGTTCGGACTTGGTATGAATATACATGGGACTCTCAAA  
GAATGCTAGATGAGTCTGATTTGCTTAAGACCCTACCAACTACGGTCCAGTTAGCCCTCGC  
30 CATTGATGTGAACCTCAGCATCATCAGCAAAGTCGACTTGTTCAAGGGTTGTGATACACAG  
ATGATTTATGACATGTTGCTAAGATTGAAATCCGTTCTCTATTTGCCTGGTGACTTTGTCTG  
CAAAAAGGGAGAAATTGGCAAGGAAATGTATATCATCAAGCATGGAGAAGTCCAAGTTCTT  
GGAGGCCCTGATGGTACTAAAGTTCTGGTACTCTGAAAGCTGGGTCCGGTGTGGAGAA  
ATCAGCCTTCTAGCAGCAGGAGGAGGAAACCGTCGAACTGCCAATGTGGTGGCCACGG  
35 GTTTGCCAATCTTTTAACTCTAGACAAAAGACCCTCCAAGAAATTCTAGTGCATTATCCAG  
ATTCTGAAAGGATCCTCATGAAGAAAGCCAGAGTGCTTTTAAAGCAGAAGGCTAAGACCGC  
AGAAGCAACCCCTCCAAGAAAAGATCTTGCCCTCCTCTTCCCACCGAAAGAAGAGACACCC  
AAACTGTTTAAACTCTCCTAGGAGGCACAGGAAAAGCAAGTCTTGCAAGACTACTCAAATT

GAAGCGAGAGCAAGCAGCTCAGAAGAAAGAAAATTCTGAAGGAGGAGAGGAAGAAGGAAA  
 AGAAAATGAAGATAAACAAAAAGAAAATGAAGATAAACAAAAAGAAAATGAAGATAAAGGAA  
 AAGAAAATGAAGATAAAGATAAAGGAAGAGAGCCAGAAGAGAAGCCACTGGACAGACCTG  
 AATGTACAGCAAGTCCTATTGCAAGTGGAGGAAGAACCCCACTCAGTTAGAAGGACAGTTTT  
 5 ACCCAGAGGGACTTCTCGTCAATCACTCATTATCAGCATGGCTCCTTCTGCTGAGGGCGGA  
 GAAGAGGTTCTTACTATTGAAGTCAAAGAAAAGGCTAAGCAATAA

SEQ ID NO: 15 – конструкция hG1.7(M8), фрагмент LCR M/L опсина, размером 1,2  
 т.п.н., фрагмент M опсина 500 п.н., UTR курсивом, подчеркнутая мутация M8

10 TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTG  
 TTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTG  
 ACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCAC  
 GATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCAAATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGC  
 CATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAAT  
 15 CGGCTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAACATCTAAT  
 CTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCGGGCAGAGCA  
 GAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCCTGGCTTGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGC  
 CCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCAC  
 CCCCTCACCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTC  
 20 TGCAAGAGTGTGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCAC  
 AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCT  
 GTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCCTTTCCAG  
 GCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGT  
 GTGGCCCAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAG  
 25 GGCAGACAGGGCGAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCC  
 CCAGACACCCCACTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAA  
 GGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTC  
 CCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTGCGCCCTGTTCAAGGCCACC  
 CAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGACAAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGA  
 30 CCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGGATCAC  
 AGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATG  
 TTAGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCCTCCCAA  
 GTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGG  
 TCTGTTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCC  
 35 AGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAA  
 TCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGG  
 AGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTA

AGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTG  
ACGCACCATTCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

SEQ ID NO: 16 – мутация М8

5 TCTAGA

SEQ ID NO: 17 – SEQ ID NO:22 - фрагмент М опсинового промотора, размером 2,0 т.п.н., подчеркнутый фрагмент SEQ ID NO: 3, размером 500 п.н., UTR курсивом, подчеркнутая мутация М8

10 TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTACTCAG  
GATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCAGCAAGTAGAGGCTGCAGTGACCTGTGACT  
GTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGACCTTGTCTCAAAAAAAAAAGAGCG  
GGGGGGGGGGCCGGGCCGGGCGTGGTGGCTCACAGCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA  
AGCCAAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCATCATGGTCAACACTGCG  
15 AAACACTGTCCCTACTAAAAATACAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACACCTGTAATC  
CCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGAGACGGAGGTTGCA  
GTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACTGACAAGAGTGAGATTGTCTCAA  
AAAAAAAAAAAAAGTAATCACTAGAAAAGAAGCTACATATGTACATAACATCCAAATAACCA  
GAGGAGAAAAAATGGGACTTGATTAATCAAAACAAAAACAAAAAGAAAGAAAGAAAGGG  
20 GGAGAAAATAAAACAAGGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGA  
AGCCAAGGTGGGTGGATCTCTTGAGCTCAGGAGGTCAAGACCAGCCTGGGCAACATGGC  
GAAACCCCGTCTCTATTAAAAAAAAAATTAATACAACAATTATCCTGGAGTGGTGGTGACA  
CCTGTAGTCCCAGCTACCCAGGACGCTGAGACGGGAGGATCGCTTGATCCCGGGGATGT  
CGAGGCTGCCGTGATCGCACCACTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCCATC  
25 TCAAAAAATAAATAAAATAAAAGCAAACAAGAAAAAAAAAAGGCTTGAAACATATCTGATAGATA  
AAGGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAAATCAGTAACTAAGAGCAAATAACCCA  
ATATAAAGACATTAAGGGTAGCCACGGACATCTCAGACGACGAAAAACAAAAGACAGTAA  
ACGTATAATAAAACATGTAATTGCAAGGTGATCCGGGAATAGTAAGCGAAAAGCAACAATTA  
AATACTATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTA AAAAGCCTAACAAATGTCCAGGGCTG  
30 GCGAGAATGTGGCAGAAGGTGATGTCACATACCCTGCAAGTGGGAATCTAACAGATTCA  
GGGTTTTGGTTTTTTTTTAATCGCAATTAGGTGGCCTGTTAAATTTTTTTTCTTGAGACAGAG  
TTTTGCTCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCTCGATCTTGCTCACCGCAACCTCGA  
CCTCCCAGGTACAAGCGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAGTACAGGTATT  
TGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTTACCATGTTAGTCA  
35 GGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGG  
GATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTG  
CCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGATTCA  
AGCGATTCTCCTGCCTCGACCTCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCT

GAGCCGCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGT  
CTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAA  
GAGGCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGCACC  
ATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCATAGCC

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Единица контроля транскрипции (TCU) длиной до 2500 нуклеотидов, содержащая в направлении от 5' к 3':

- 5 (a) локус-контролирующую область (LCR), содержащую
- (i) SEQ ID NO 1; или
  - (ii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей с указанной последовательностью (a) (i); и
- (b) промоторный элемент, содержащий
- 10 (i) по меньшей мере 200 нуклеотидов или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17; или
- (ii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей с указанной последовательностью (b) (i);

причем указанная TCU демонстрирует промоторную активность, специфичную в отношении колбочкового фоторецептора.

15

2. TCU по п. 1, где (b) содержит:

- (i) по меньшей мере последние 200 нуклеотидов или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, или
- (ii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей с указанной последовательностью (i);

20

причем указанная TCU демонстрирует промоторную активность, специфичную в отношении колбочкового фоторецептора.

3. TCU по п. 2, где (b) содержит:

- 25 (i) по меньшей мере последние 500 нуклеотидов или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 17, или
- (ii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей с указанной последовательностью (i);

30

причем указанная TCU демонстрирует промоторную активность, специфичную в отношении колбочкового фоторецептора.

4. TCU по любому из пп. 1-3, где (b) содержит по меньшей мере 200 нуклеотидов SEQ ID NO: 3.

35

5. TCU по любому из пп. 1-4, где (b) содержит последовательность из по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидов 1 - 35 SEQ ID NO: 3, или последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов,

выбранных из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательностей с нуклеотидами 1 - 35 SEQ ID NO: 3.

6. TCU по любому из пп. 1-5, где (b) содержит:

(i) SEQ ID NO: 3; или

(ii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ной идентичность последовательностей с указанной последовательностью (i);

причем указанная TCU демонстрирует промоторную активность, специфичную в отношении колбочкового фоторецептора.

7. TCU по п. 6, в которой нуклеотиды 1934 - 1939 (GGGCCG) SEQ ID NO: 2 заменены SEQ ID NO: 16.

8. TCU по п. 6, где TCU содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 15.

9. TCU по любому из пп. 1-4, где промоторный элемент содержит SEQ ID NO: 5.

10. TCU по п. 9, где TCU содержит SEQ ID NO: 6.

11. Экспрессионная конструкция, содержащая TCU по любому из пп. 1-10, функционально связанную с последовательностью, подлежащей экспрессии специфичным в отношении колбочкового фоторецептора образом.

12. Экспрессионная конструкция по п. 11, в которой функционально связанная последовательность представляет собой *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *GNAT2*, *KCNV2* или *CACNA2D4*.

13. Экспрессионная конструкция по п. 12, в которой функционально связанная последовательность содержит SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14, или которая имеет по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 и обладает способностью восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора.

14. Экспрессионная конструкция по п. 12 или п. 13, в которой функционально связанная последовательность содержит SEQ ID NO: 8, или которая имеет по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 8 и обладает способностью восстанавливать функцию колбочкового фоторецептора.

15. Вектор, содержащий TCU по любому из пп. 1-10 или экспрессионную конструкцию по любому из пп. 11 - 14.

16. Вектор по п. 15, который представляет собой вирусный вектор.

5

17. Вектор по п. 16, который представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

18. Вектор по п. 17, где вектор содержит геном AAV или его производное.

10

19. Вектор по п. 18, где вектор содержит геном AAV или его производное, и где капсид AAV происходит из AAV8.

20. Вектор по п. 19, в котором капсид AAV происходит из AAV8, и экспрессионная конструкция определена по любому из пп. 11 - 14.

15

21. Вектор по п. 20, в котором функционально связанная последовательность представляет собой *CNGA3*.

22. Вектор по любому из пп. 18 - 21, в котором указанное производное представляет собой химерное, «перетасованное» или капсид-модифицированное производное.

20

23. Вектор по любому из пп. 18 - 22, в котором указанный геном AAV происходит из серотипа или изолята или клады AAV природного происхождения.

25

24. Вектор по п. 23, в котором указанный геном AAV происходит из серотипа 2 AAV (AAV2), серотипа 4 AAV (AAV4) или серотипа 8 AAV (AAV8), и/или где капсид происходит из AAV8.

30

25. Вектор по п. 24, в котором геном происходит из AAV2, и капсид происходит из AAV8.

26. Клетка-хозяин, которая содержит вектор по любому из пп. 15 - 25 или продуцирует вирусный вектор по любому из пп. 15 - 25.

35

27. Клетка по п. 26, которая представляет собой клетку HEK293 или HEK293T.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по любому из пп. 15 – 25 и фармацевтически приемлемый носитель.

5 29. Вектор по любому из пп. 15-25 для применения в способе предупреждения или лечения нарушений сетчатки.

30. Применение вектора по любому из пп. 15-25 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения нарушений сетчатки.

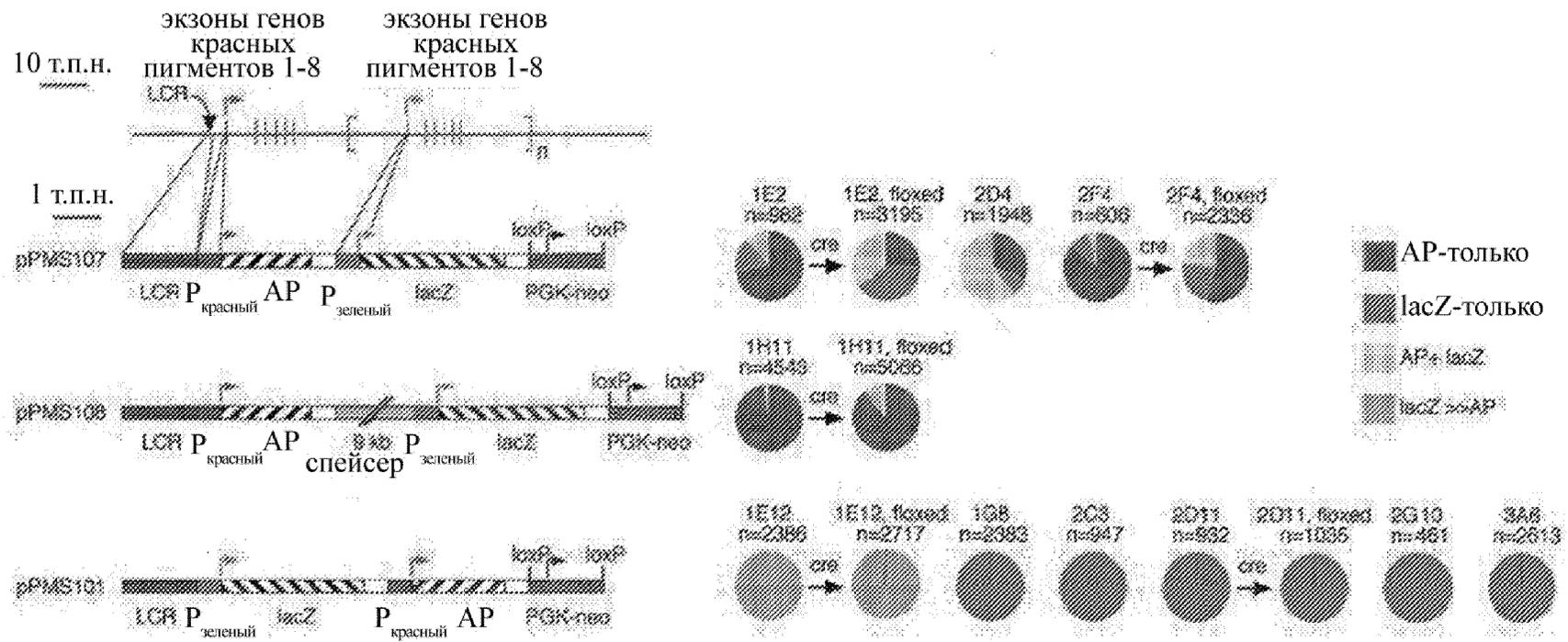
10 31. Способ лечения или предупреждения нарушений сетчатки у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества вектора по любому из пп. 15 - 25.

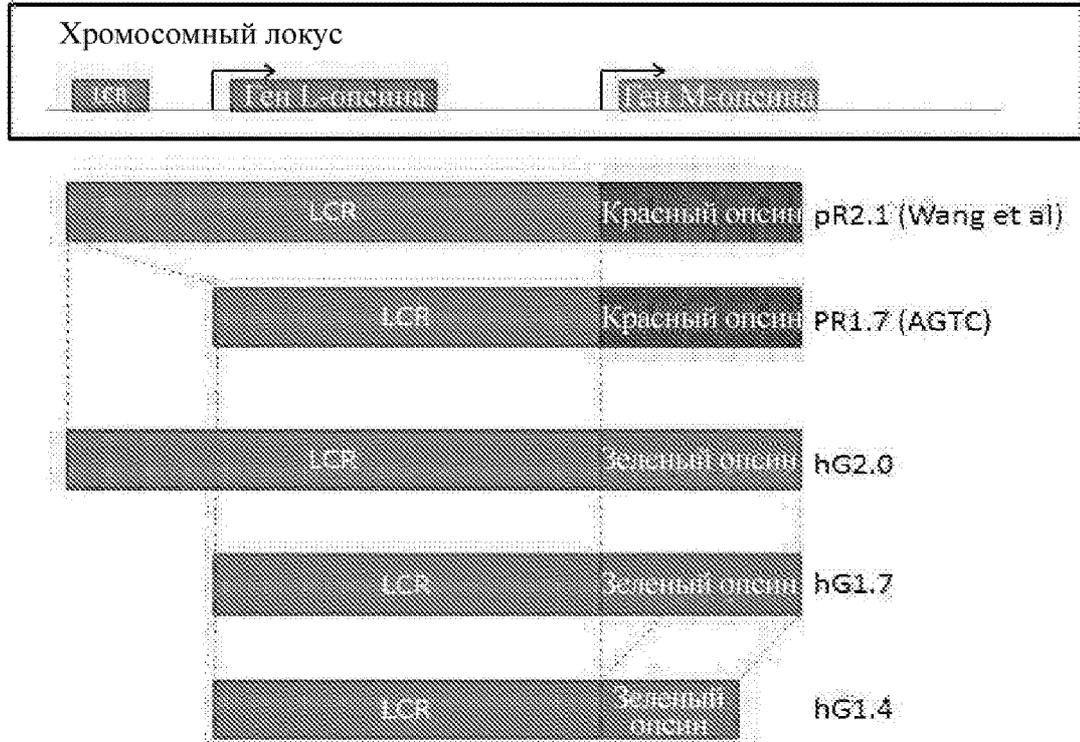
15 32. Вектор для применения по п. 29 или применение по п. 30 или способ по п. 31, где нарушение сетчатки представляет собой ахроматопию.

20 33. Вектор для применения по п. 29 или п. 32 или применение или способ по любому из пп. 30-32, где лечение или предупреждение осуществляется посредством введения вектора по любому из пп. 15 - 25 пациенту посредством инъекции прямо в сетчатку, субретинальной или интравитреальной инъекции.

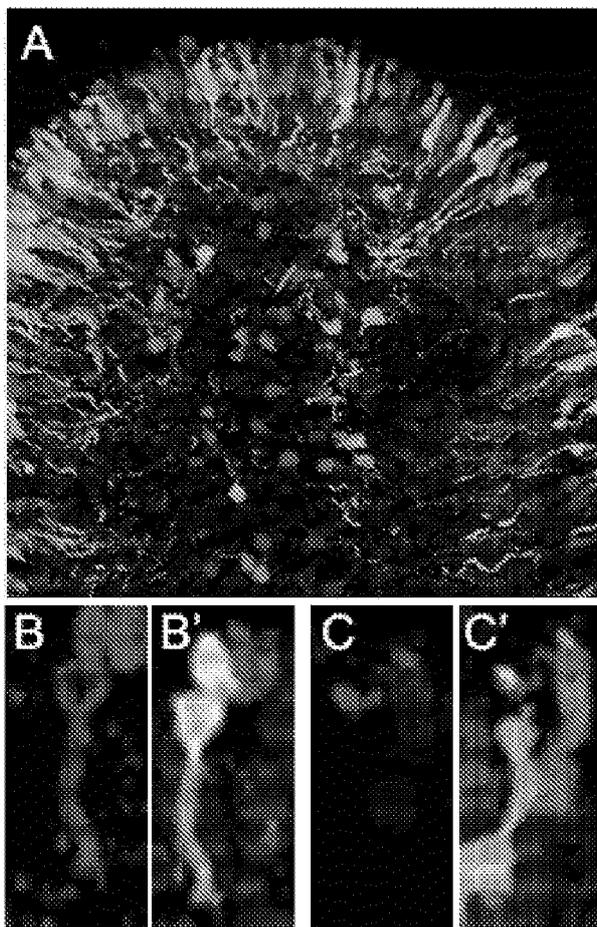
25 34. Вектор для применения, применение или способ по п. 33, где указанный вектор вводят прямо в пространство сетчатки, субретинальное пространство или интравитреальное пространство.

ФИГ. 1

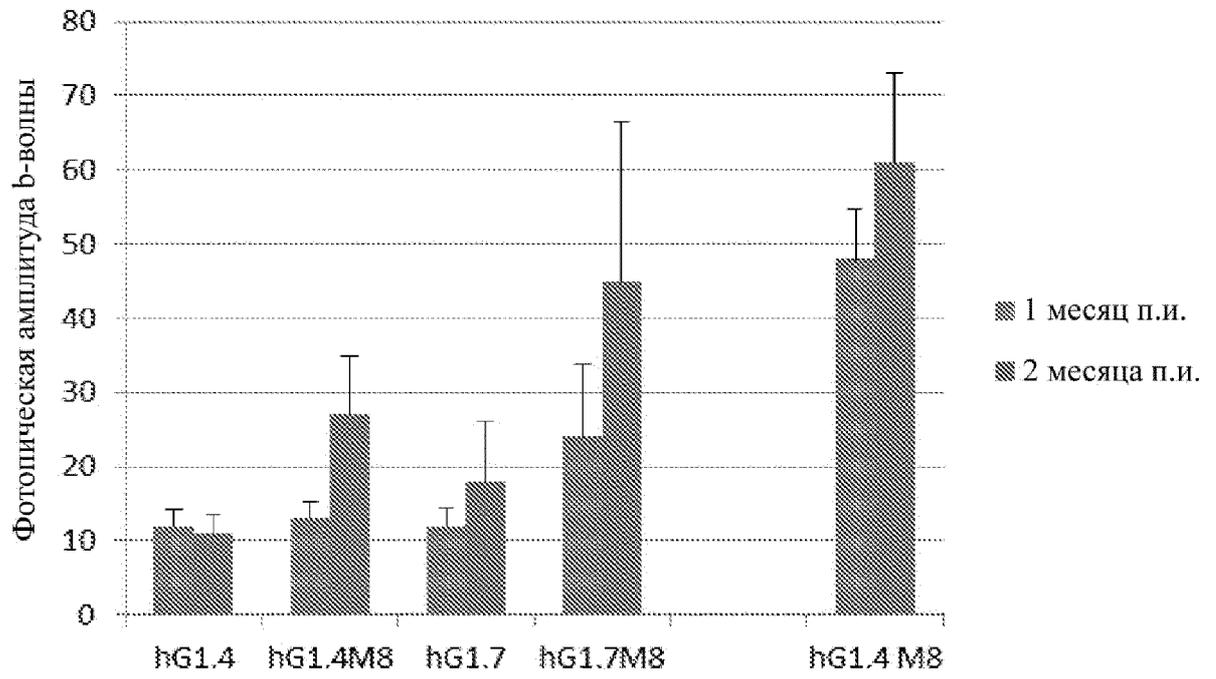




ФИГ. 2



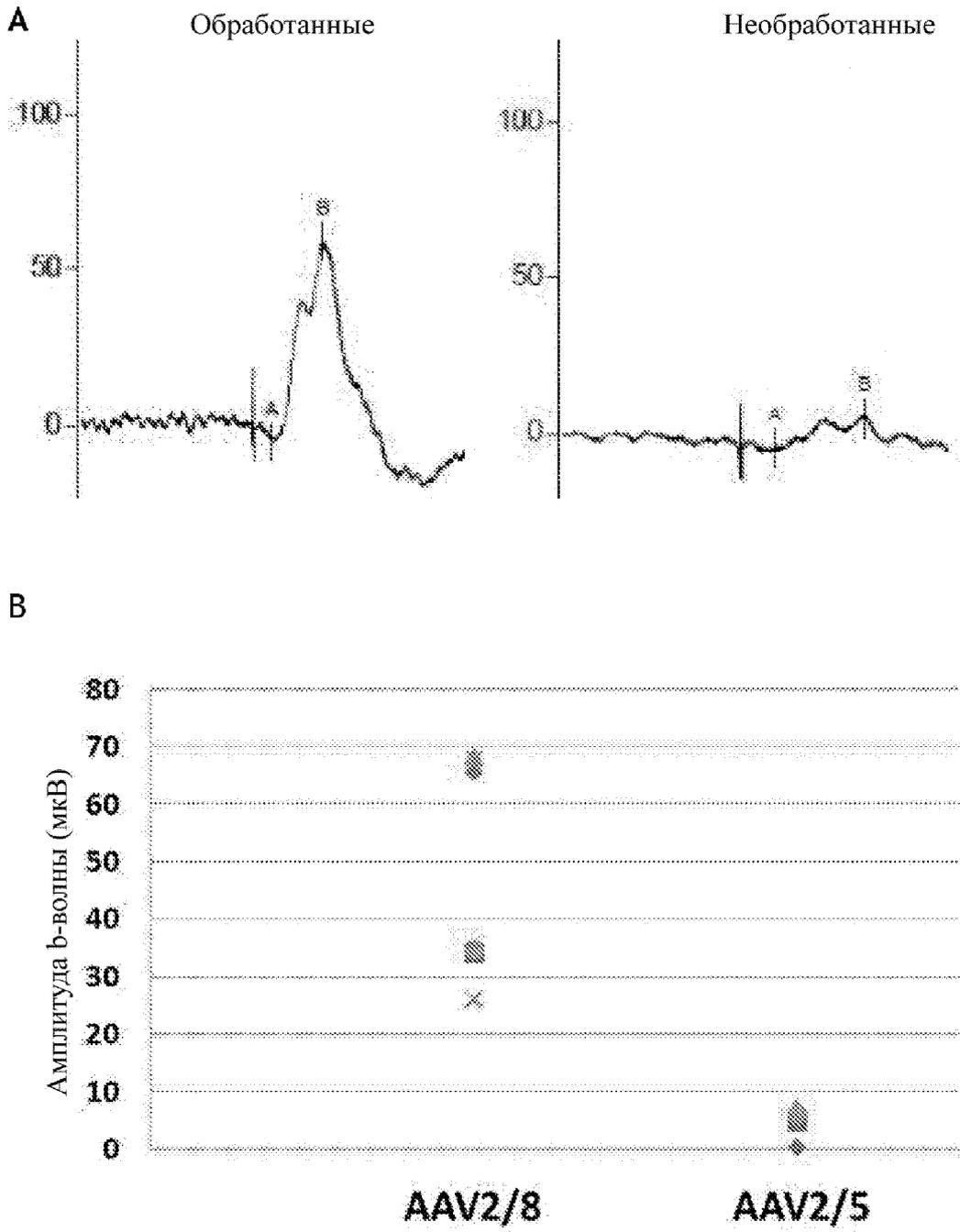
*ФИГ. 3*



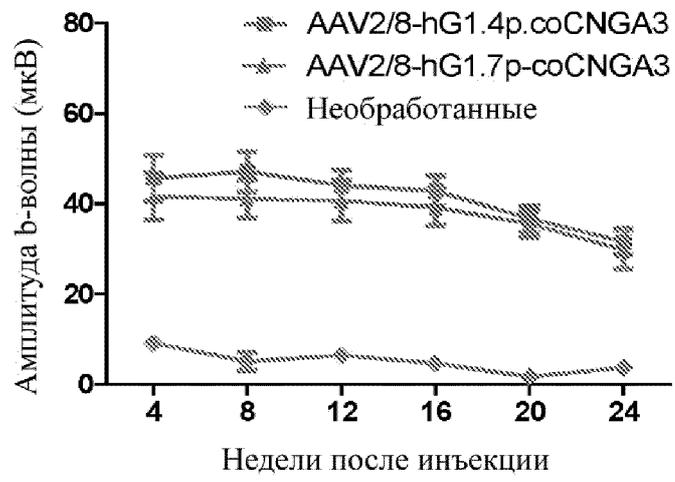
ФИГ. 4

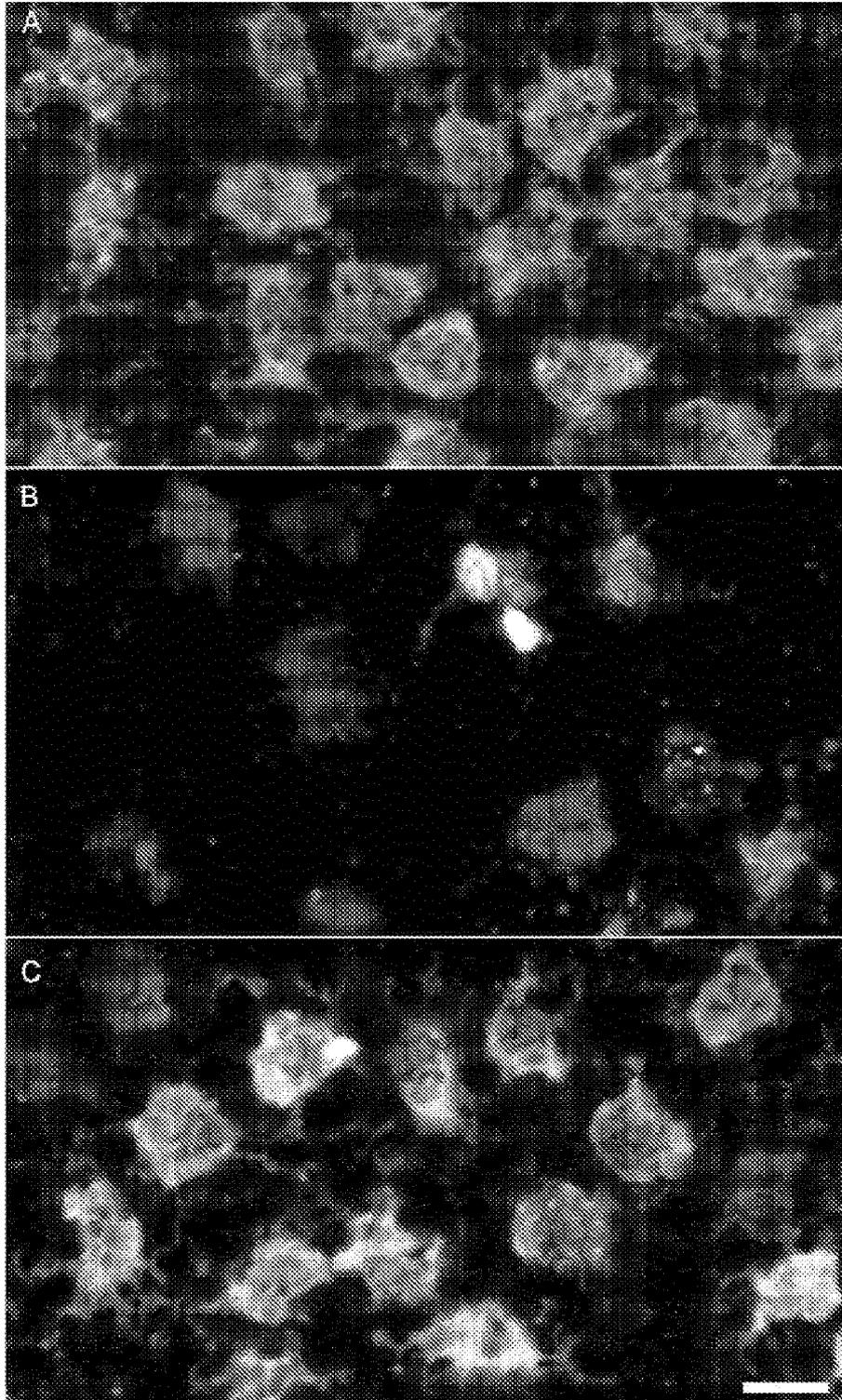


ФИГ. 5

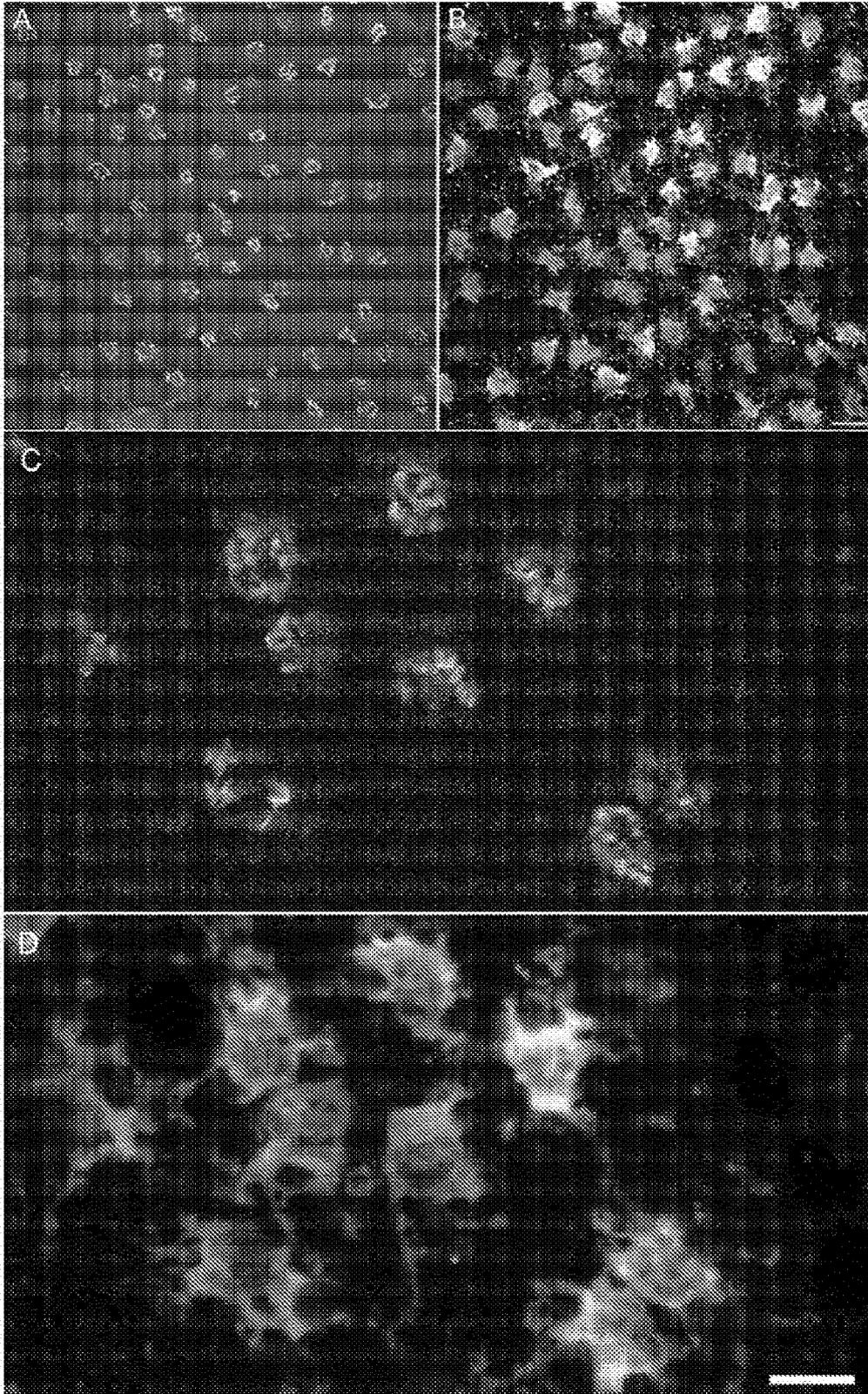


ФИГ. 6

**ФИГ. 7**

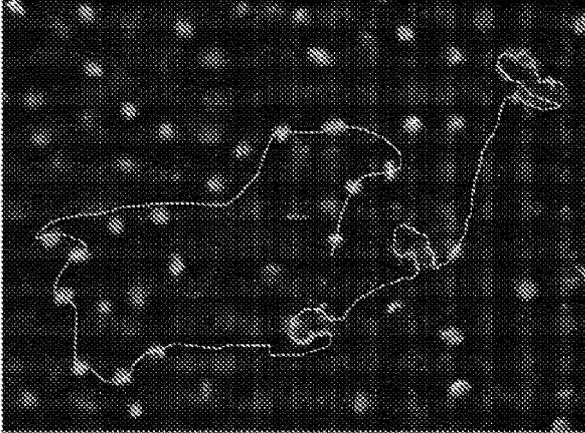


*ФИГ. 8*

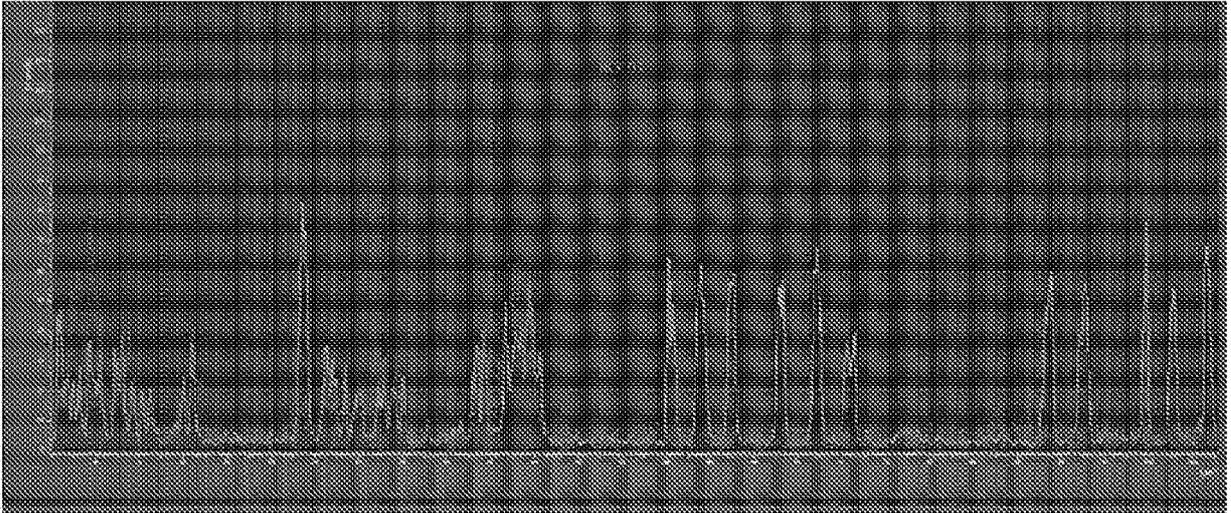


ФИГ. 9

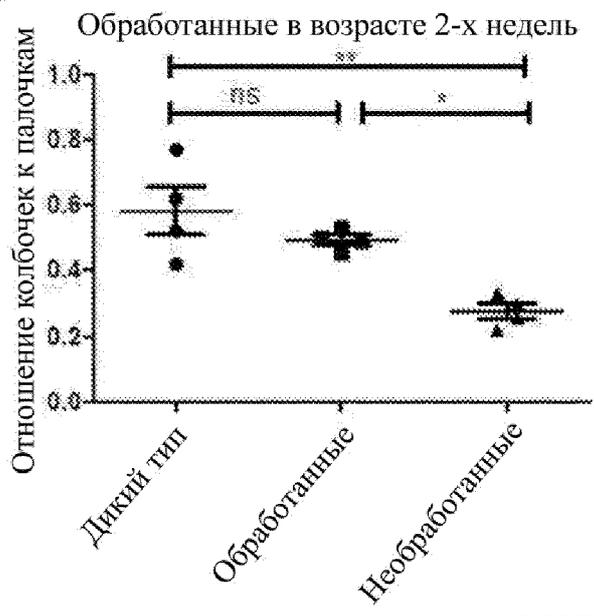
A



B

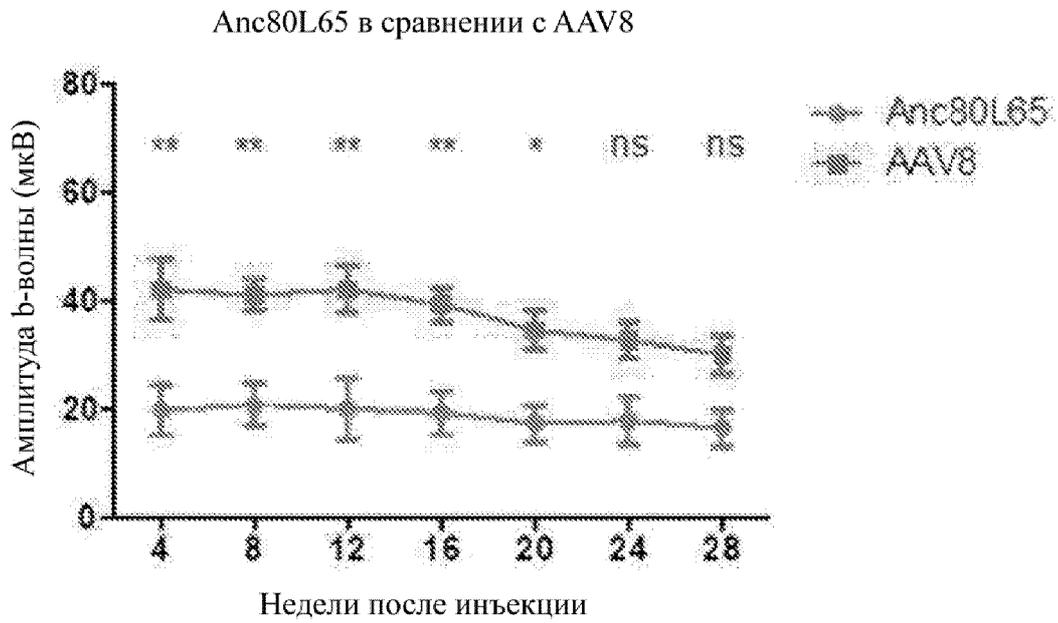


C

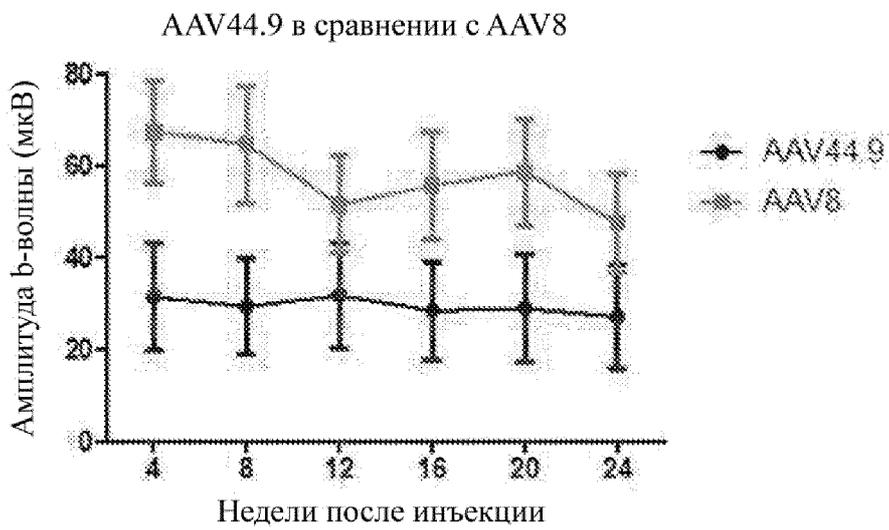


ФИГ. 10

A

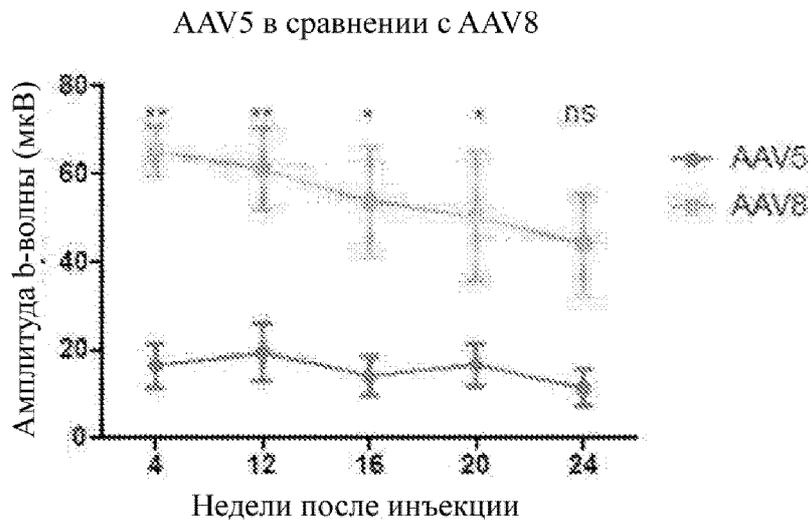


B



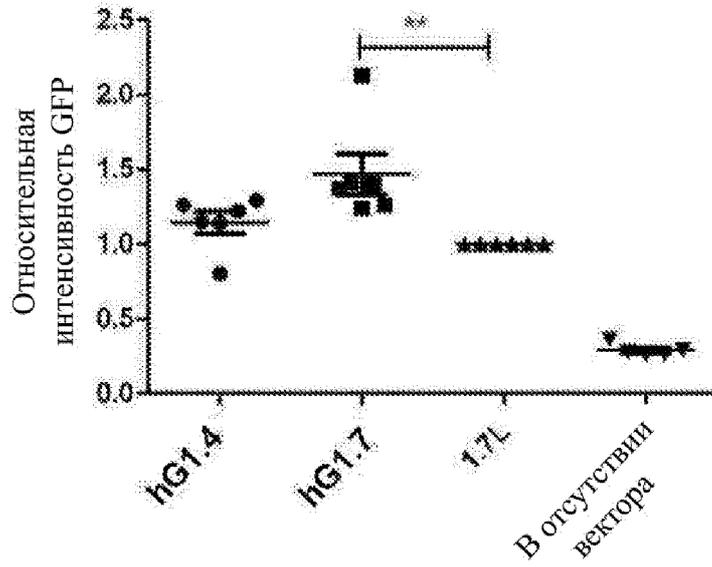
ФИГ. 11

С

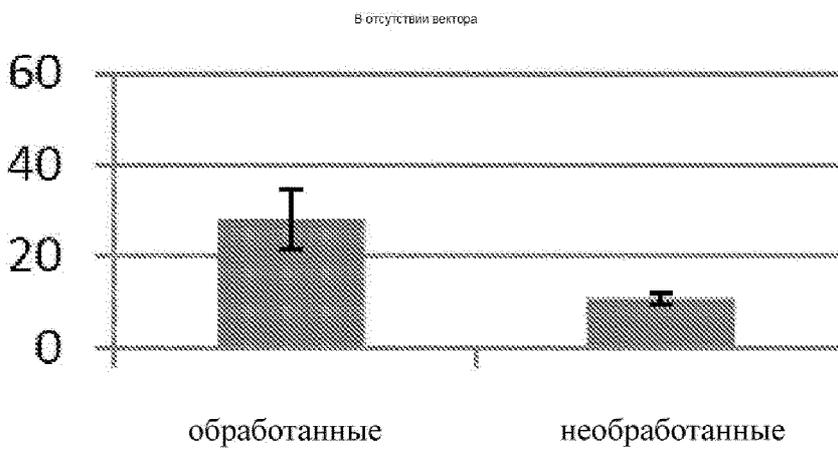


ФИГ. 11 (продолжение)

А  
Средняя интенсивность флуоресценции GFP-позитивных клеток



В



ФИГ. 12