

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091995 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.30

(22) Дата подачи заявки
2019.02.22

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕ СВЯЗАННОГО С ВОЗРАСТОМ
НАРУШЕНИЯ СЛУХА У СУБЪЕКТА-ЧЕЛОВЕКА

(31) 62/634,088

(32) 2018.02.22

(33) US

(86) PCT/US2019/019268

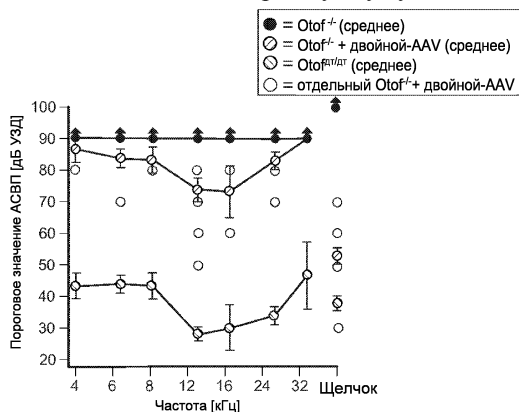
(87) WO 2019/165292 2019.08.29

(71) Заявитель:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Саймонс Эммануэль Джон, Нг Роберт
(US), Райзингер Эллен, Ал-Моед
Ханан, Куглер Себастиан (DE)

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

(57) В данном документе предложены композиции, которые содержат по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, причем каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, и применение этих композиций для лечения потери слуха у субъекта.



A1

202091995

202091995

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564401EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕ СВЯЗАННОГО С ВОЗРАСТОМ НАРУШЕНИЯ СЛУХА У СУБЪЕКТА-ЧЕЛОВЕКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/634 088, поданной 22 февраля 2018 г.; полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 21 февраля 2019 г., называется SequenceListing.txt.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение в целом относится к применению нуклеиновых кислот для лечения потери слуха у субъекта-человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ухо представляет собой сложный орган, который классически описывается как включающий внешнее ухо, среднее ухо, внутреннее ухо, слуховой (акустический) нерв и слуховую систему (которая обрабатывает звук при его перемещении от уха к мозгу). Ухо не только улавливает звук, но и помогает поддерживать равновесие. Таким образом, нарушения внутреннего уха могут вызвать потерю слуха, шум в ушах, головокружение и нарушение равновесия. Головокружение представляет собой ложное ощущение движения и является основным симптомом заболевания вестибулярной системы. Головокружение может быть вызвано проблемами во внутреннем ухе или центральной нервной системе. Общие причины головокружения во внутреннем ухе включают: вестибулярный неврит (внезапную одностороннюю потерю вестибулярной функции), болезнь Меньера (эпизодическое головокружение), доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение (BPPV) и двустороннюю потерю вестибулярной функции. Общие причины головокружения со стороны центральной нервной системы включают: постконтузионный синдром, шейное головокружение, вестибулярную мигрень, цереброваскулярные заболевания и акустическую неврому.

Потеря слуха является одним из наиболее распространенных сенсорных нарушений у человека и может возникать по многим причинам. Некоторые люди могут иметь врожденное нарушение слуха, в то время как другие могут терять слух со временем. Пресбиакузис (также пишется как пресбикузис) представляет собой возрастную потерю слуха. Около 36 миллионов взрослых американцев сообщают о некоторой степени потери слуха, причем каждый третий человек старше 60 лет и половина из тех, кто старше 85 лет, страдают потерей слуха.

Потеря слуха может возникнуть в результате влияния факторов окружающей среды

или сочетания генетических факторов и факторов окружающей среды. Около половины всех людей, имеющих тиннитус, - фантомные шумы в слуховой системе (звон, гудение, щебетание, жужжание или биение) - также имеют сверхчувствительность/сниженную толерантность к определенным звуковым частотам и диапазонам громкости, что известно как гиперacusия (также пишется как «гиперокузия»). Синдром Вильямса (также известный как синдром Вильямса - Бойрена) представляет собой мультисистемное заболевание, вызванное гемизиготной делецией области размером 1,6 млн п. н. в 7q11.23, включающей около 26 генов, в том числе ген, кодирующий LIM-киназу 1 (LIMK1). У индивидуумов с синдромом Вильямса проявляются гиперacusия и прогрессирующая потеря слуха, а раннее начало гиперacusии позволяет предположить, что это может быть связано с одним из удаленных генов.

К связанным с окружающей средой причинам потери слуха относятся прием некоторых лекарств, определенные инфекции до или после рождения, а также воздействие громкого шума в течение длительного периода. Потеря слуха может быть вызвана шумом, ототоксическими агентами, пресбиакузией, болезнью, инфекцией или злокачественными новообразованиями, которые поражают определенные части уха. Ишемическое повреждение может вызвать потерю слуха посредством инициированных патофизиологических механизмов. В качестве другого примера аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED) характеризуется быстро прогрессирующей двусторонней нейросенсорной потерей слуха, возникающей, когда иммунная система организма атакует клетки внутреннего уха, которые ошибочно принимаются за вирус или бактерии.

Примерно 1,5 из 1000 детей рождаются с полной потерей слуха, а еще двое-трое на 1000 детей рождаются с частичной потерей слуха (Smith et al., 2005, Lancet 365:879-890). Более половины этих случаев объясняются генетической причиной (Di Domenico, et al., 2011, J. Cell. Physiol. 226:2494-2499).

Несиндромальная глухота представляет собой потерю слуха, не связанную с другими признаками и симптомами. Напротив, синдромальная глухота связана с потерей слуха, которая возникает при нарушениях в других частях тела. Большинство случаев генетической глухоты (от 70 до

80 процентов) являются несиндромальными; остальные случаи вызваны конкретными генетическими синдромами.

Потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей в слуховом проходе или среднем ухе), нейросенсорной (возникающей во внутреннем ухе или слуховом нерве) или смешанной. Большинство форм несиндромальной глухоты связаны с необратимой потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота). Подавляющее большинство случаев нейросенсорной потери слуха человека вызвано аномалиями волосковых клеток органа Корти в улитке. Существуют также очень необычные нейросенсорные нарушения слуха, которые затрагивают восьмой черепной нерв (преддверно-улитковый нерв) или слуховые части мозга. При самых редких из этих видов потери слуха поражаются только слуховые центры головного мозга. В этой ситуации,

при корковой глухоте, звуки могут быть слышны в нормальном диапазоне, но качество воспринимаемого звука настолько плохое, что речь понимать невозможно. Однако в большинстве случаев нейросенсорная потеря слуха связана с недостаточной функцией волосковых клеток. Волосковые клетки могут быть аномальными при рождении или повреждаться в течение жизни человека. Существуют как внешние причины повреждения, такие как шумовая травма и инфекция, так и внутренние аномалии, такие как врожденные мутации в генах, которые играют важную роль в анатомии или физиологии улитки.

Потеря слуха в результате изменений в среднем ухе называется кондуктивной потерей слуха. Некоторые формы несиндромальной глухоты включают изменения как во внутреннем, так и в среднем ухе, что называется смешанной потерей слуха. Потеря слуха, которая присутствует до того, как ребенок научится говорить, классифицируется как предъязыковая или врожденная. Потеря слуха, возникающая после развития речи, классифицируется как постязыковая. Большинство аутосомно-рецессивных локусов приводят к от тяжелой до полной предъязыковой потере слуха.

Несиндромальная глухота может иметь разные типы наследования и возникать в любом возрасте. Типы несиндромальной глухоты названы в соответствии с их типами наследования. Аутосомно-доминантные формы обозначены DFNA, аутосомно-рецессивные формы обозначены DFNB, а X-сцепленные формы обозначены DFN. Каждый тип также пронумерован в том порядке, в котором он был описан. Например, DFNA1 был первым описанным аутосомно-доминантным типом несиндромальной глухоты.

От 75 до 80 процентов случаев наследуются по аутосомно-рецессивному типу, что означает, что обе копии гена в каждой клетке имеют мутации. Как правило, каждый родитель человека с аутосомно-рецессивной глухотой является носителем одной копии мутировавшего гена, но не поражен этой формой потери слуха.

Еще от 20 до 25 процентов случаев несиндромальной глухоты являются аутосомно-доминантными, что означает, что одной копии измененного гена в каждой клетке достаточно, чтобы привести к потере слуха. Люди с аутосомно-доминантной глухотой чаще всего наследуют измененную копию гена от родителей, страдающих потерей слуха.

От 1 процента до 2 процентов случаев демонстрируют X-сцепленный тип наследования, что означает, что мутировавший ген, ответственный за патологическое состояние, расположен в X-хромосоме (одной из двух половых хромосом). У мужчин с X-сцепленной несиндромальной глухотой наблюдается тенденция к развитию более серьезной потери слуха в более раннем возрасте, чем у женщин, унаследовавших копию такой же генной мутации. Характерной чертой X-сцепленного наследования является то, что отцы не могут передавать X-сцепленные признаки своим сыновьям.

Митохондриальная несиндромальная глухота, которая возникает в результате изменений митохондриальной ДНК, встречается менее чем в одном проценте случаев в США. Измененная митохондриальная ДНК передается от матери всем ее сыновьям и дочерям. Этот тип глухоты не передается по наследству от отца.

Заболевание спектра аудиторных нейропатий (ANSD), нарушение слуха,

характеризующееся нормальной функцией наружных волосковых клеток и аномальной или отсутствующей слуховой реакцией в мозговом стволе, является одним из наиболее распространенных заболеваний, приводящих к слуховому и речевому коммуникационному барьеру у младенцев и маленьких детей. Около 10 процентов детей с постоянной потерей слуха могут иметь ANSD. Ген OTOF представляет собой первый ген, идентифицированный для аутосомно-рецессивного несиндромального ANSD, и было обнаружено, что мутации в OTOF составляют около 5% всех случаев аутосомно-рецессивной несиндромальной потери слуха в некоторых популяциях (Rodriguez-Ballesteros et al. 2008 *Human Mut* 29(6):823-831).

Причины несиндромальной глухоты являются комплексными. Исследователи выявили более 30 генов, которые, будучи изменены, связаны с несиндромальной глухотой; однако некоторые из этих генов не были полностью охарактеризованы. Разные мутации в одном и том же гене могут быть связаны с разными типами потери слуха, а некоторые гены связаны как с синдромальной, так и с несиндромальной глухотой.

Например, гены, связанные с несиндромальной глухотой, включают, но не ограничиваются ими, ATP2B2, ACTG1, CDH23, CLDN14, COCH, COL11A2, DFNA5, DFNB31, DFNB59, ESPN, EYA4, GJB3, KCNQ4, LHFPL5, MYO1A, MYO15A, MYO6, MYO7A, OTOF, PCDH15, SLC26A4, STRC,TECTA, TMC1, TMIE, TMPRSS3, TRIOBP, USH1C и WFS1.

Наиболее частой причиной потери слуха является несиндромальная потеря слуха и глухота, DFNB1 (также называемая несиндромальной потерей слуха и глухотой с DFNB1, связанными с GJB2; аутосомно-рецессивной глухотой 1; нейросенсорной несиндромальной рецессивной глухотой 1). Несиндромальная потеря слуха и глухота (DFNB1) характеризуется врожденным, непрогрессирующим, нейросенсорным нарушением слуха от легкого до полного. Она вызвана мутациями в GJB2 (который кодирует белок коннексин 26) и GJB6 (который кодирует коннексин 30). Диагностика DFNB1 зависит от молекулярно-генетического тестирования для выявления вызывающих глухоту мутаций в GJB2 и расположенных против хода транскрипции цис-регуляторных элементах, которые изменяют бета-2 белок межклеточных щелевых контактов (коннексин 26). При помощи молекулярно-генетического тестирования GJB2 обнаруживают более 99% вызывающих глухоту мутаций в этих генах. В отличие от некоторых других форм потери слуха, несиндромальная потеря слуха и глухота DFNB1 не влияет на равновесие или движение. Основываясь на том, какая генетическая мутация присутствует у человека, трудно предсказать степень потери слуха. Даже если члены одной семьи страдают несиндромальной потерей слуха и глухотой DFNB1, степень потери слуха у них может быть разной.

Мутации в генах, кодирующих коннексин 26 (Cx26) и/или Cx30, связаны примерно с половиной всех случаев аутосомной несиндромальной предъязыковой глухоты. Cx26 и Cx30 являются двумя основными изоформами Cx, присутствующими в улитке, а их сборка происходит одновременно с образованием гибридных (гетеромерных и гетеротипических) щелевых соединений (GJ) (Ahmad, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2007, 104(4):1337-1341).

Несиндромальная потеря слуха и глухота DFNA3 вызывается доминантно-отрицательным патогенным вариантом в гене GJB2 или GJB6 с изменением белка коннексина 26 (Cx26) или коннексина 30 (Cx30), соответственно, и характеризуется пред- или постязыковым прогрессирующим высокочастотным нейросенсорным нарушением слуха от легкого до полного.

Связанная с ОТОФ глухота (несиндромальная потеря слуха DFNB9), характеризуется двумя фенотипами: предязыковая несиндромальная потеря слуха и, реже, температурно-чувствительная несиндромальная слуховая нейропатия (TS-NSAN). Другая форма прогрессирующего нарушения слуха связана с мутацией в гене отоферлина (например, мутация I1573T или мутация P1987R, и/или мутация E1700Q) или не чувствительна к температуре.

Синдром Пендреда/DFNB4 (глухота с зобом) является аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием и составляет 7,5% всех случаев врожденной глухоты. Синдром Пендреда был связан с мутациями в гене PDS (также известном как DFNB4, EVA, PDS, TDH2B и член 4 семейства транспортеров растворенных веществ 26, SLC26A4) на длинном плече хромосомы 7 (7q31), который кодирует белок пендрин. Мутации в этом гене также вызывают синдром расширенного водопровода преддверия (EVA или EVAS), еще одну врожденную причину глухоты; определенные мутации с большей вероятностью вызывают EVAS, в то время как другие более связаны с синдромом Пендреда. (Azaiez, et al. (December 2007), Hum. Genet. 122 (5): 451-7).

Трансмембранная сериновая протеаза 3-го типа представляет собой фермент, кодируемый геном TMPRSS3 (также известный как DFNB10, DFNB8, ECHOS1 и TADG12). Этот ген был идентифицирован по его ассоциации как с врожденной, так и с аутосомно-рецессивной глухотой с началом в детстве. Мутации в TMPRSS3 связаны с постязыковым и быстро прогрессирующим нарушением слуха. Белок, кодируемый геном TMPRSS3, содержит домен сериновой протеазы, трансмембранный домен, домен, подобный рецептору ЛПНП, и богатый цистеином домен фагоцитарного рецептора. Известно, что сериновые протеазы участвуют во множестве биологических процессов, нарушение которых часто приводит к заболеваниям и расстройствам человека. Этот ген экспрессируется в улитке плода и многих других тканях и, как полагают, участвует в развитии и поддержании внутреннего уха или содержимого перилимфы и эндолимфы. Этот ген также был идентифицирован как связанный с опухолью ген, который сверхэкспрессируется в опухолях яичников. Было описано четыре альтернативно сплайсированных варианта, два из которых кодируют идентичные продукты.

Глухота DFNB3 вызвана мутациями в гене POU3F4, который расположен в X-хромосоме. У людей с этим заболеванием одна из мелких костей в среднем ухе (стремечко) не может нормально двигаться, что препятствует функции слуха. Этот характерный признак DFNB3 называется фиксацией стремечка. По меньшей мере четыре других участка X-хромосомы вовлечены в потерю слуха, но ответственные гены не были обнаружены. DFNB59 (глухота, аутосомно-рецессивный тип 59), также известный как пейвакин или

PJVK, представляет собой белок из 352 аминокислот, принадлежащий к семейству гасдермина, у позвоночных. DFNB59 кодируется геном, который картируется в хромосоме 2q31.2 человека, необходимым для правильного функционирования нейронов слухового пути и функции наружных волосковых клеток. Считается, что мутации в DFNB59 вызывают несиндромальную нейросенсорную глухоту аутосомно-рецессивного типа 59, форму нейросенсорного нарушения слуха, характеризующуюся отсутствием или серьезной аномалией слуховой реакции в мозговом стволе, но нормальной отоакустической эмиссией (слуховая нейропатия или слуховая диссинхрония). DFNB59 имеет значительное сходство с DFNA5, что указывает на то, что эти гены имеют общее происхождение.

Синдром Альпорта вызывается мутациями в генах COL4A3, COL4A4 и COL4A5, участвующих в биосинтезе коллагена. Мутации в любом из этих генов препятствуют правильной выработке или сборке сети коллагена типа IV, которая является важным структурным компонентом базальных мембран в почках, внутреннем ухе и глазах. Одним из критериев, используемых при диагностике синдрома Альпорта, является двусторонняя нейросенсорная потеря слуха в диапазоне от 2000 до 8000 Гц. Потеря слуха развивается постепенно, отсутствует в раннем младенчестве и, как правило, проявляется в возрасте до 30 лет.

Дефекты в ионных каналах связаны с глухотой: несиндромальная потеря слуха DFNA2 наследуется как аутосомно-доминантная мутация в гене KCNQ4, который кодирует член 4 подсемейства потенциал-зависимых калиевых каналов KQT, также известный как субъединица Kv7.4 потенциал-зависимых калиевых каналов. Несиндромальная потеря слуха DFNA2 характеризуется симметричной, преимущественно высокочастотной нейросенсорной потерей слуха (SNHL), прогрессирующей на всех частотах. В более молодом возрасте потеря слуха имеет тенденцию быть легкой на низких частотах и умеренной на высоких частотах; у старших людей потеря слуха является легкой на низких частотах и от тяжелой до полной на высоких частотах. Хотя нарушение слуха часто выявляется при обычной проверке слуха у ребенка школьного возраста, вполне вероятно, что слух нарушен с рождения, особенно на высоких частотах. Большинству людей с нарушениями изначально требуются слуховые аппараты для усиления звука в возрасте от десяти до 40 лет. К 70 годам все люди с потерей слуха DFNA2 имеют нарушение слуха от тяжелого до полного.

Мутации в генах KCNE1 и KCNQ1 вызывают синдром Джервелла - Ланге - Нильсена (JLNS), тип синдрома удлиненного интервала QT, связанный с тяжелой двусторонней потерей слуха. Это патологическое состояние представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, которое, по оценкам, поражает от 1,6 до 6 из 1 миллиона детей, и на него приходится менее 10 процентов всех случаев синдрома удлиненного интервала QT. Заметно выше заболеваемость в Норвегии и Швеции - до 1:200000. Белки, продуцируемые генами KCNE1 и KCNQ1, функционируют вместе, образуя калиевый канал, который переносит положительно заряженные ионы калия из клеток. Движение ионов калия по этим каналам имеет решающее значение для поддержания нормальных функций внутреннего уха и

сердечной мышцы.

Синдром EAST/SeSAME, характеризующийся умственной отсталостью, атаксией, судорогами, потерей слуха и ренальной потерей соли, как полагают, вызван мутациями в KCNJ10 калиевых каналов внутреннего выпрямления.

Субъекты с синдромом Барттера с нейросенсорной глухотой 4 типа (также известный как синдром Барттера IV или BSND) имеют дефекты во вспомогательной субъединице Cl⁻-канала.

Мутации в гене ATP6V1B1, экспрессируемом как в почках, так и в улитке, связаны с дистальным ренальным тубулярным ацидозом (DRTA). У значительного процента детей с аутосомно-рецессивным DRTA также обнаруживается прогрессирующая двусторонняя нейросенсорная потеря слуха.

Синдром Ушера (также известный как синдром Халлгрена, синдром Ушера - Халлгрена, синдром пигментного ретинита-дизакузии и синдром дистрофии сетчатки-дизакузии) представляет собой редкое заболевание, вызванное мутацией в любом из по меньшей мере десяти генов, приводящей к комбинации потери слуха и постепенного ухудшения зрения, что является основной причиной слепоглухоты. Потеря слуха вызвана дефектом внутреннего уха, тогда как потеря зрения является результатом пигментного ретинита (ПП), дегенерации клеток сетчатки. Синдром Ушера имеет три клинических подтипа, обозначаемых как I, II и III. Субъекты с синдромом Ушера I рождаются глухими и начинают терять зрение в первое десятилетие жизни, медленно учатся ходить в детстве из-за проблем с вестибулярной системой и демонстрируют трудности с равновесием. Субъекты с синдромом Ушера II не рождаются глухими, но страдают от потери слуха, но, по-видимому, не имеют заметных проблем с равновесием; они также начинают терять зрение позже (на втором десятилетии жизни) и могут сохранять частичное зрение даже в среднем возрасте. Субъекты с синдромом Ушера III не рождаются глухими, но постепенно теряют слух и зрение; у них могут быть трудности с равновесием или нет.

Мышиная модель врожденной глухоты была получена путем внесения нулевой мутации в ген, кодирующий везикулярный транспортер глутамата-3 (VGLUT3). Недавно было достигнуто восстановление слуха у мышей с нокаутом VGLUT3 с помощью вирус-опосредованной генной терапии (Akil, et al., 2012, Neuron 75:283-293).

Math1 (мышинный гомолог ATH1; также известный как HATH1 или Atonal, Drosophila, гомолог (АТОН1)) необходим для развития волосковых клеток во внутреннем ухе; поэтому было предложено, что Math1 действует как «ген предшественников волосковых клеток» в развивающемся сенсорном эпителии (Bermingham et al., 1999, Science 284:1837-1841). Несколько исследований продемонстрировали регенерацию волосковых клеток в поврежденной улитке мышей и улучшение слуха и равновесия с помощью вирусной доставки Math1 (Baker et al., 2009, Adv. Otorhinolaryngol. 66:52-63; Husseman and Raphael, 2009, Adv. Otorhinolaryngol. 66:37-51; Izumikawa et al., 2008, Hear. Res. 240:52-56; Kawamoto et al., 2003, J. Neurosci. 23:4395-4400; Praetorius et al., 2010, Acta Otolaryngol. 130:215-222; Staecker et al., 2007, Otol. Neurotol. 28:223-231).

Мутации в гене WFS1 вызывают более 90 процентов случаев синдрома Вольфрама 1-го типа; синдром Вольфрама представляет собой патологическое состояние, при котором поражаются многие системы организма, чаще всего характеризующееся высоким уровнем сахара в крови в результате нехватки гормона инсулина (сахарный диабет) и прогрессирующей потерей зрения из-за дегенерации нервов, передающих информацию от глаз в головной мозг (атрофия зрительного нерва). Однако люди с синдромом Вольфрама часто также имеют дисфункцию гипофиза, которая приводит к выделению чрезмерного количества мочи (несахарный диабет), потере слуха, вызванной изменениями во внутреннем ухе (нейросенсорная глухота), проблемам с мочевыводящими путями, снижению количества полового гормона тестостерона у мужчин (гипогонадизм) или неврологическим или психиатрическим расстройствам. Около 65 процентов людей с синдромом Вольфрама имеют нейросенсорную глухоту, степень тяжести которой может варьироваться от глухоты при рождении до легкой потери слуха в подростковом возрасте, которая со временем ухудшается. Кроме того, примерно у 60 процентов людей с синдромом Вольфрама развиваются неврологические или психические расстройства, чаще всего проблемы с равновесием и координацией (атаксия), как правило, начинающиеся в раннем взрослом возрасте.

Ген WFS1 кодирует белок под названием вольфрамин, который, как считается, регулирует количество кальция в клетках. Когда синдром Вольфрама вызван мутациями в гене WFS1, он наследуется по аутосомно-рецессивному типу, а белок вольфрамин имеет пониженную или отсутствующую функциональность. В результате уровень кальция в клетках не регулируется, а эндоплазматический ретикулум не функционирует должным образом. Когда в эндоплазматическом ретикулуме не хватает функционального вольфрамина, клетка инициирует собственную гибель (апоптоз). Гибель клеток поджелудочной железы, в частности клеток, вырабатывающих инсулин (бета-клетки), вызывает сахарный диабет у людей с синдромом Вольфрама. Постепенная потеря клеток вдоль зрительного нерва в конечном итоге приводит к слепоте у пораженных людей. Гибель клеток в других системах организма, вероятно, вызывает различные признаки и симптомы синдрома Вольфрама 1-го типа.

Было обнаружено, что мутации в митохондриальных генах MT-TS1 и MT-RNR1 увеличивают риск развития несиндромальной глухоты. Несиндромальная митохондриальная потеря слуха и глухота характеризуются потерей слуха от умеренной до полной. Патогенные варианты MT-TS1, как правило, связаны с нейросенсорной потерей слуха с началом в детстве. Патогенные варианты MT-RNR1 связаны с предрасположенностью к потере слуха, если они подвергаются воздействию определенных антибиотиков, называемых аминогликозидами (ототоксичность), и/или нейросенсорной потере слуха с поздним началом; однако у некоторых людей с мутацией в гене MT-RNR1 развивается потеря слуха даже без воздействия этих антибиотиков. Потеря слуха, связанная с аминогликозидной ототоксичностью, является двусторонней, от тяжелой до полной, и возникает в течение от нескольких суток до недель после введения любого количества

(даже одной дозы) аминогликозидного антибиотика, такого как гентамицин, тобрамицин, амикацин, канамицин или стрептомицин.

В настоящее время лечение потери слуха включает усиление слуха при потере от легкой до тяжелой и кохлеарную имплантацию при потере от тяжелой до полной (Kral and O'Donoghue, 2010, N. Engl. J. Med. 363:1438-1450). На сегодняшний день большинство исследований в этой области сосредоточено на регенерации волосковых клеток улитки, применимой при наиболее распространенных формах потери слуха, включая пресбиакузис, шумовое повреждение, инфекцию и ототоксичность.

На животных моделях ишемии улитки ишемическое повреждение можно предотвратить с помощью таких соединений, как инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), AM-111 (ингибитор апоптоза), эдарабон (акцептор свободных радикалов), гинзенозид RB 1 (Карро), нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), BDNF, CNTF, SOD1, SOD2, некростатин-1, DFNA5 и MSRB3. Тем не менее, похоже, что комбинация веществ может быть более эффективной, чем одно соединение (например, дополнительные терапевтические средства для модуляции окислительного стресса, экзотоксичности, кровотока, перегрузки кальцием и стимуляции, путей апоптоза, механизмов нейротрофического или гормонального контроля).

Ингибирование индуцированного JNK-1 апоптоза (индуцированного митохондриями) можно предотвратить с помощью таких соединений, как доминантно-отрицательный JNK-1 и d-стероизомер JNK-1 (Mol. Pharmacol. 2007 March; 71(3):654-66; содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки).

Сохраняется давно назревшая потребность в агентах и способах предотвращения или исправления глухоты.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 приведено типовое схематическое представление генетической карты 5'- и 3'-векторов для трансдукции двойным AAV во внутренних волосковых клетках (ВВК) с использованием подхода транс-сплайсинга. В 5'-векторе энхансер CMV (CMVe) и промотор β -актина человека (hbA) управляют транскрипцией мРНК, кодирующей eGFP, и пептид P2A, который расщепляется во время трансляции. 5'-вектор также содержит кДНК, кодирующую N-концевую часть отоферлина, и донорный сайт сплайсинга (SD). Последовательность ДНК SD была представлена в Trapani et al. (2014) *EMBO Mol Med* 6 194-211. В 3'-векторе акцепторный сайт сплайсинга (SA) был субклонирован после первого инвертированного концевой повтора (ITR) и перед 3' частью кодирующей последовательности отоферлина. За ним следуют стабилизирующие мРНК последовательности, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) и сигнал полиаденилирования (pA).

На Фиг. 2 приведено типовое схематическое представление генетической карты 5'- и 3'-векторов для трансдукции двойным AAV в ВВК с использованием гибридного подхода. В дополнение к элементам, описанным на Фиг. 1, высокорекомбиногенные последовательности из последовательностей фага F1 (AK) были включены на 3'-конце 5'-

вектора и на 5'-конце 3'-вектора для обеспечения правильной сборки вектора (Trapani et al. (2014) EMBO Mol Med 6 194-211).

На Фиг. 3 представлен график, демонстрирующий амплитуду акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) с течением времени у нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} мышей (n=25; тонкая черная линия) и *Otof*^{-/-} мышей после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина (n=14; серые линии представляют отдельных животных, толстая черная линия представляет средний ответ для всех животных).

На Фиг. 4 представлен график, демонстрирующий амплитуду АСВП с течением времени у нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} мышей (n=25; длинная пунктирная линия), *Otof*^{-/-} мышей после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина (n=14; короткая пунктирная линия) и *Otof*^{fm/fm} мышей дикого типа после двойного AAV с усиленной трансдукцией зеленого флуоресцентного белка (eGFP) (n=5; тонкие черные линии представляют отдельных животных, толстая черная линия представляет среднюю амплитуду для всех животных).

На Фиг. 5 представлен иллюстративный график, демонстрирующий пороговое значение АСВП (в дБ УЗД) по частоте (в кГц) в ответ на чистые тоны или щелчки. Минимальный уровень звукового давления (УЗД), при котором могут быть обнаружены волны, отображается для отдельных *Otof*^{-/-} животных с опосредованной двойным AAV экспрессией отоферлина (белые кружки представляют отдельных животных, кружки с заливкой диагональной линией представляет среднее пороговое значение для всех животных), для нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} животных (черные кружки) и для *Otof*^{fm/fm} животных после двойного AAV с трансдукцией eGFP (кружок с клетчатой заливкой) в ответ на чистые тоны или щелчки.

На Фиг. 6 представлен график, демонстрирующий частоты трансдукции ВБК вдоль улитки (например, весь орган Корти, апикальный поворот и среднебазальный/базальный поворот), определенные иммуногистохимическим методом с использованием двух разных антител, одно из которых связывает N-концевой фрагмент отоферлина, а другое связывание с самой С-концевой частью отоферлина.

На Фиг. 7 представлен набор иммуногистохимических изображений одного органа Корти *Otof*^{-/-} мыши после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина. Кальбиндин использовали в качестве маркера внутренних и наружных волосковых клеток. Клетки, экспрессирующие eGFP, указывают на вирусную трансдукцию по меньшей мере 5' вируса. Левая и средняя панели демонстрируют окрашивание антителом против отоферлина (Abscam) в N-концевой половине отоферлина. На правой панели показано окрашивание антителом против С-концевого отоферлина (Synaptic Systems). Вместе все три панели демонстрируют, что полноразмерный отоферлин экспрессируется в ВБК. Важно отметить, что несмотря на то, что AAV трансдуцируют несколько типов клеток в органе Корти (на что указывает флуоресценция eGFP), экспрессия отоферлина ограничивается внутренними волосковыми клетками. Масштабная линейка: 100 мкм.

На Фиг. 8 представлен график, демонстрирующий Ca^{2+} токи над стимулом

деполяризации для *Otof*^{-/-}ВБК (белый; n=10), *Otof*^{-/-} ВБК после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина (диагональная линия; n=8) и ВБК дикого типа от сопоставимых по фону контрольных животных (черные; n=6).

На Фиг. 9 представлен график, демонстрирующий емкость плазматической мембраны (ΔC_m) в зависимости от продолжительности деполяризации в ВБК, трансдуцированных двойным AAV, от *Otof*^{-/-} мышей (черная линия, отдельные ВБК; ромб с заливкой диагональной линией: среднее $\pm$ СОС; n=8), в двух отдельных трансдуцированных двойным AAV ВБК от инъецированных *Otof*^{-/-} мышей (пунктирная линия), которые демонстрировали только незначительный экзоцитоз, и сопоставимых по фону контролей дикого типа (черные ромбы; n=6). Данные для дикого типа из Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535 показаны черными кружками для сравнения.

На Фиг. 10 представлен иллюстративный график, демонстрирующий Q_{real} в зависимости от продолжительности деполяризации (мс) в *Otof*^{-/-} ВБК (белый ромб), ВБК, трансдуцированных двойным AAV, от *Otof*^{-/-} мышей (черный кружок) и сопоставимых по фону контролей дикого типа (черный ромб).

На Фиг. 11 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB.

На Фиг. 12 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-SA-3'mOTOF-EWB.

На Фиг. 13 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD.

На Фиг. 14 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK.

На Фиг. 15 представлен график, демонстрирующий емкость плазматической мембраны (ΔC_m) в зависимости от продолжительности деполяризации в ВБК от *Otof*^{-/-} мышей, трансдуцированных двумя векторами, приведенными на Фиг. 2 (средняя штриховка; жирная линия), ВБК у мышей дикого типа (темная штриховка; линия средней толщины) и ВБК у *Otof*^{-/-} мышей.

На Фиг. 16 представлен иллюстративный график, демонстрирующий Q_{real} в зависимости продолжительности деполяризации (мс) в *Otof*^{-/-} ВБК (белый ромб), ВБК от *Otof*^{-/-} мышей, трансдуцированных двумя векторами, приведенными на Фиг. 2 (серые ромбы), и ВБК от сопоставимых по фону контролей дикого типа (черный ромб).

На Фиг. 17 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB.

На Фиг. 18 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD.

На Фиг. 19 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK.

На Фиг. 20 представлена иллюстративная плазмидная карта pAAV-SA-3'mOTOF-EWB.

На Фиг. 21 приведено типовое схематическое представление части pAKOS102 (SEQ ID NO: 43).

На Фиг. 22 приведено типовое схематическое представление части pAKOS103 (SEQ ID NO: 44).

На Фиг. 23 приведено типовое схематическое представление части pAKOS103.

На Фиг. 24 приведена типовая плазмидная карта pAKOS104 (SEQ ID NO: 45).

На Фиг. 25 приведено типовое схематическое представление части pAKOS104-DHFR (SEQ ID NO: 46).

На Фиг. 26 приведено типовое схематическое представление части pAKOS104-DHFR.

На Фиг. 27 приведено типовое схематическое представление части pAKOS105 (SEQ ID NO: 47).

На Фиг. 28 приведено типовое схематическое представление части pAKOS105.

На Фиг. 29 приведено типовое схематическое представление части pAKOS105_GFP (SEQ ID NO: 48).

На Фиг. 30 приведено типовое схематическое представление части pAKOS106 (SEQ ID NO: 49).

На Фиг. 31 приведено типовое схематическое представление части pAKOS106.

На Фиг. 32 приведено типовое схематическое представление части pAKOS107 (SEQ ID NO: 50).

На Фиг. 33 приведено типовое схематическое представление части pAKOS107.

На Фиг. 34 приведено типовое схематическое представление части pAKOS108 (SEQ ID NO: 51).

На Фиг. 35 приведено типовое схематическое представление части pAKOS108.

На Фиг. 36 приведено типовое схематическое представление части pAKOS109 (SEQ ID NO: 52).

На Фиг. 37 приведено типовое схематическое представление спейсера фактора VIII (SEQ ID NO: 54-57).

На Фиг. 38 приведено типовое схематическое представление p109 (SEQ ID NO: 84).

На Фиг. 39 приведено типовое схематическое представление p105 (SEQ ID NO: 85).

На Фиг. 40 приведено типовое схематическое представление 105.WPRE.

На Фиг. 41 приведено типовое схематическое представление p108.

На Фиг. 42 приведено типовое схематическое представление 1OTOF18.CL1.

На Фиг. 43 приведено типовое схематическое представление 19OTOF48.

На Фиг. 44 приведено типовое схематическое представление 1OTOF20.CL1.

На Фиг. 45 приведено типовое схематическое представление 21OTOF48.WPRE.

На Фиг. 46 приведено типовое схематическое представление 1OTOF21.CL1.

На Фиг. 47 приведено типовое схематическое представление 22OTOF48.WPRE.

На Фиг. 48 приведено типовое схематическое представление 105.pA.NTF3.CMVd.

На Фиг. 49 приведен иммуноблот, демонстрирующий экспрессию полноразмерного

отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных различными указанными парами плазмид.

На Фиг. 50 приведена таблица, демонстрирующая количественное определение экспрессии полноразмерного отоферлина человека в трех повторностях эксперимента, описанного на Фиг. 49.

На Фиг. 51 приведен график пороговых значений АСВП на щелчки у мышей дикого типа, которые не получали лечение вектором, или *Otof*^{-/-} мышей, которые не получали вектор или получали лечение векторами DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и p109). Слух у *Otof*^{-/-} мышей, которым вводили векторы DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и 109), измеряли через 26-28 суток и 91 суток после лечения.

На Фиг. 52 приведен график пороговых значений АСВП на тональную посылку у мышей дикого типа, которые не получали лечение вектором, или *Otof*^{-/-} мышей, которые не получали вектор или получали лечение векторами DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и p109). Слух у *Otof*^{-/-} мышей, которым вводили векторы DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и 109), измеряли через 26-28 суток и 91 суток после лечения.

На Фиг. 53 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD (SEQ ID NO: 87).

На Фиг. 54 приведено типовое схематическое представление части pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE (SEQ ID NO: 88).

На Фиг. 55 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD-AK.

На Фиг. 56 приведено типовое схематическое представление части pAAV-AK-SA-3'mOTOF.WPRE.

На Фиг. 57 приведено типовое схематическое представление части pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK.

На Фиг. 58 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP.

На Фиг. 59 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AK.

На Фиг. 60 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD-AK.

На Фиг. 61 приведено типовое схематическое представление части pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD.

На Фиг. 62 приведено типовое схематическое представление части pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD.

На Фиг. 63 приведено типовое схематическое представление части pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD-AK.

На Фиг. 64 приведено типовое схематическое представление части pAAV-CBA-5'hOTOFcodop-SD-AK.

На Фиг. 65 приведено типовое схематическое представление части pAAV-CBA-

5'hOTOF-SD.

На Фиг. 66 приведено типовое схематическое представление части pAAV-SA-3'OTOF.

На Фиг. 67 приведено типовое схематическое представление части pAAV-AP-SA-3'OTOF.

На Фиг. 68 приведено типовое схематическое представление части pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop.

На Фиг. 69 приведен типовой иммуноблот, демонстрирующий экспрессию полноразмерного отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных с использованием реагента для трансфекции ДНК jetPRIME® (polyplus) с 600 нг различных указанных пар плазмид. Дорожка 1 содержала предварительно набор окрашенных маркерных белков. Дорожка 2 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAKOS104 (как показано на Фиг. 24 и 59) и вектором pAKOS105 (как показано на Фиг. 27, 28 и 39). Дорожка 3 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAKOS108 (как показано на Фиг. 34, 35, 41 и 57) и вектором pAKOS105 (как показано на Фиг. 27, 28 и 39). Дорожка 4 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAKOS109 (как показано на Фиг. 36 и 38) и вектором pAKOS105 (как показано на Фиг. 27, 28 и 39). Дорожка 5 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на Фиг. 60) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на Фиг. 68). Дорожка 6 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на Фиг. 63) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на Фиг. 68). Дорожка 7 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAAV_CBA-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на Фиг. 64) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на Фиг. 68). Дорожка 8 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAKOS102 (как показано на Фиг. 21) и вектором pAKOS103 (как показано на Фиг. 22, 23 и 66). Дорожка 9 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором CBA.TS и вектором pAKOS103 (как показано на Фиг. 22, 23 и 66). Дорожка 10 содержала образец белка из клеток HEK293FT, которые были трансфицированы вектором pAKOS106 (как показано на Фиг. 30, 31 и 58) и pAKOS107 (как показано на Фиг. 32, 33 и 67). Через девять часов после трансфекции клетки собирали и лизировали с использованием буфера RIPA и анализировали в 4-12% геле для белка Bolt, который затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Человеческий отоферлин обнаруживали с помощью поликлонального антитела против OTOF (Thermo PA5-52935). Человеческий бета-актин использовали в качестве первичного антитела для внутреннего контроля для нанесения между дорожками. Эксперимент повторяли в трех экземплярах. Относительные количественные измерения для каждого эксперимента представлены под иммуноблотом вместе со средним значением и стандартным отклонением (станд. откл.).

На Фиг. 70 приведен иммуноблот, демонстрирующий экспрессию полноразмерного отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных разными парами плазмид, указанными при различной множественности заражения (MOI). Клетки HEK293FT высевали в течение ночи из расчета 4×10^4 клеток/лунку на 96-луночный планшет. Через шесть часов после посева двойные векторы добавляли в каждую лунку. Через девять часов после трансфекции клетки собирали и лизировали с использованием буфера RIPA и анализировали в 4-12% геле для белка Bolt, который затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Человеческий отоферлин обнаруживали с помощью поликлонального антитела против OTOF (Thermo PA5-52935). Человеческий бета-актин использовали в качестве первичного антитела для внутреннего контроля для нанесения между дорожками. Дорожка 1: CBA.OTOF (AK) с MOI 503000; дорожка 2: CBA.OTOF (AK) с MOI 1 510 000; дорожка 3: CBA.OTOF (AK) с MOI 100000; дорожка 4: CBA.OTOF (AK) с MOI 303000; дорожка 5: CMV.OTOF (AK) с MOI 638000; дорожка 6: CMV.OTOF (AK) с MOI 1910000; дорожка 7: CMV.OTOF (AK) с MOI 127000; дорожка 8: CMV.OTOF (AK) с MOI 382000; дорожка 9: отрицательный контроль.

На Фиг. 71 представлен набор иммуногистохимических изображений одного органа Корти Otof-/- мыши в возрасте P17 после одностороннего интракохлеарного введения двойных векторов на основе AAV, экспрессирующих CBA.hOTOF (AK) (векторы p105 и 109). Ипсилатеральную улитку извлекали и анализировали на экспрессию белка с помощью иммуногистохимии в трех различных частотных областях (основание - верхушка).

На Фиг. 72 приведен график, демонстрирующий процент внутренних волосковых клеток (ВВК), меченных N- и С-концевыми частями отоферлина, у CD1B6F1-*Otof*^{-/-} мышей, которым инъецировали двойной AAV-TS (n=10 мышей) и двойной AAV-Hyb (n=9 мышей), (в возрасте P18-P30). Отдельные животные показаны незаштрихованными символами. Данные отображаются как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), н.з. - $P > 0,05$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, критерий Уилкоксона для связанных выборок и метода знаков и непарный t-критерий с поправкой Уэлча.

На Фиг. 73 приведен график, демонстрирующий средние уровни иммунофлуоресценции N-концевого и С-концевого отоферлина в трансдуцированных двойным AAV *Otof*^{-/-} внутренних волосковых клетках (ВВК) и внутренних волосковых клетках дикого типа от мышей (в возрасте P23-30). Уровни отоферлина нормализовали до уровней иммунофлуоресценции в нетрансдуцированных ВВК дикого типа B6 для каждого антитела отдельно. Количество определенных ВВК указано внутри столбцов. Данные отображаются как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), н.з. - $P > 0,05$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, критерий Краскела-Уоллиса с последующим критерием множественного сравнения Дьюнна.

На Фиг. 74 приведен график, демонстрирующий количество синаптических лент, определенное по внутренним волосковым клеткам (ВВК) апикальных поворотах улиток для ВВК дикого типа (B6: n=48 ВВК, CD1B6F1: n=108 ВВК), трансдуцированных *Otof*^{-/-} (двойной-AAV- TS: n=59 ВВК, двойной-AAV-Hyb: n=37 ВВК) и нетрансдуцированных

Otof^{-/-} ВВК из инъектированных (-инъектированного AAV уха, n=65 ВВК) и контралатеральных неинъекционных ушей (-неинъектированное AAV ухо, n=46 ВВК) (от мышей в возрасте P25-P29. Отдельные животные показаны незаштрихованными символами. Данные отображаются в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), н.з.- $P > 0,05$, ** $P \leq 0,001$ (тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом множественного сравнения Дьюнна).

На Фиг. 75 приведен график, демонстрирующий количество синапсов, определенное по внутренним волосковым клеткам (ВВК) в апикальных витках (с) мышей В6 дикого типа (Р6: n=53 ВВК; Р14: n=73 ВВК) и *Otof*^{-/-} мышей В6 (Р6: n=62 ВВК; Р14: n=65 ВВК) на двух разных стадиях развития (Р6 и Р14). Отдельные животные показаны незаштрихованными символами. Данные отображаются в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), н.з.- $P > 0,05$, ** $P \leq 0,001$ (тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом множественного сравнения Дьюнна).

На Фиг. 76 приведен график, демонстрирующий суммарные амплитуды I-V волн акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) при разной интенсивности звука щелчка у инъектированных двойным AAV отоферлина, неинъектированных *Otof*^{-/-} мышей и контрольных мышей дикого типа в возрасте P23-30. Количество проанализированных мышей: животные дикого типа CD1B6F1 (+AAV.eGFP: n=12 мышей, двойной-AAV-TS: n=6 мышей) и *Otof*^{-/-} животные CD1B6F1 (двойной-AAV-TS: n=16 мышей, двойной-AAV-Hyb: n=8 мышей, = AAV: n=38 мышей). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС). Отдельные животные показаны незаштрихованными символами.

На Фиг. 77 приведен график, демонстрирующий суммарные амплитуды I-V волн акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) отдельных *Otof*^{-/-} животных CD1B6F1, получавших двойной AAV-TS (n=8 животных; на Фиг. 76), в зависимости от их частоты трансдукции полноразмерным отоферлином внутренних волосковых клеток (ВВК) (на Фиг. 5, С-концевая часть отоферлина). r : коэффициент корреляции. = 8 мышей, = AAV: n=38 мышей). Отдельные животные показаны незаштрихованными символами. $r \geq 0,5$ - положительная корреляция (70 децибел уровня звукового давления (дБ УЗД) и 90 дБ УЗД: коэффициент корреляции Пирсона; 50 дБ УЗД: коэффициент корреляции Спирмена).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано на открытии того факта, что композиция, содержащая по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, причем каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, может быть использована для создания последовательности, кодирующей активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин) в клетке млекопитающего, и таким образом лечить несиндромальную нейросенсорную тугоухость у субъекта, нуждающегося в этом.

В данном документе предложены композиции, которые содержат по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, причем: каждый из по меньшей мере двух разных

векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей состоит из по меньшей мере 30 аминокислотных остатков в длину, при этом аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой одной из кодируемых частей; ни один вектор из по меньшей мере двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин; по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не имеет последовательности интрона между двумя соседними экзонами; и при введении в клетку млекопитающего по меньшей мере два разных вектора подвергаются конкатемеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций, каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций, каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой искусственную хромосому человека (HAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC), искусственную бактериальную хромосому (BAC) или искусственную хромосому на основе бактериофага P1 (PAC). В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций, каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой вирусный вектор, выбранный из вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусного вектора, лентивирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций, каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой вектор на основе AAV.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций аминокислотная последовательность одной из кодируемых частей перекрывается с аминокислотной последовательностью другой одной из кодируемых частей. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей частично перекрывается с аминокислотной последовательностью другой кодируемой части. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от около 30 аминокислотных остатков до около 1000 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций векторы включают два разных вектора, каждый из которых содержит другой сегмент интрона, причем интрон содержит нуклеотидную последовательность интрона, который присутствует в геномной ДНК отоферлина, и где два разных сегмента перекрываются в последовательности по меньшей мере на 100 нуклеотидов. В некоторых

вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций два разных сегмента перекрываются в последовательности на от около 100 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере двух разных векторов имеет длину от около 500 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере двух разных векторов имеет длину от 500 нуклеотидов до 5000 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций количество разных векторов в композиции равно двум. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый из двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций длина N-концевой части белка отоферлина составляет от 30 аминокислот до 1600 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций длина N-концевой части белка отоферлина составляет от 200 аминокислот до 1500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый вектор дополнительно содержит промотор и/или последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый вектор содержит промотор, который является индуцибельным промотором, конститутивным промотором или тканеспецифическим промотором.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 39 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 39), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 40 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 41 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 41), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 42 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 42).

мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 84 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 84), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 85 (или содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 85).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций один из по меньшей мере двух разных векторов содержит последовательность, кодирующую белок NTF3.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций, причем последовательность, кодирующая белок NTF3, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый вектор дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую домен дестабилизации, причем дестабилизирующий домен расположен с 3' к кодирующей последовательности, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, содержит экзоны 1-21 изоформы 5 гена отоферлина человека.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций второй из двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций длина С-концевой части белка отоферлина составляет от 30 аминокислот до 1600 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций длина С-концевой части белка отоферлина составляет от 200 аминокислот до 1500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций второй вектор дополнительно содержит поли(dA) сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций кодирующая последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, содержит экзоны 22-47 изоформы 5 гена отоферлина человека. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций второй вектор

дополнительно содержит последовательности для стабилизации мРНК. Некоторые варианты осуществления любой из описанных в данном документе композиций дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

В данном документе также предложены наборы, которые содержат любую из описанных в данном документе композиций. Некоторые варианты осуществления любого из описанных в данном документе наборов дополнительно включают предварительно заполненный шприц, содержащий композицию.

В данном документе также предложены способы, которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций ранее было идентифицировано, что млекопитающее имеет дефектный ген отоферлина.

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, которые включают введение любой из описанных в данном документе композиций в клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов ранее было определено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, которые включают: введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов ранее было идентифицировано, что млекопитающее имеет дефектный ген отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов млекопитающее представляет собой человека.

В данном документе также предложены способы лечения несиндромальной нейросенсорной потери слуха у субъекта, идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, которые включают введение терапевтически эффективного количества композиции любой из описанных в данном документе композиций в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект представляет собой человека. Некоторые варианты осуществления любого из описанных в данном документе способов дополнительно включают, до стадии введения, определение того, что у субъекта имеется дефектный ген отоферлина.

Также в данном документе предложены композиции, которые содержат два разных

вектора- нуклеиновые кислоты, причем: первый вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновых кислот содержит промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' промотора, и сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности; и второй вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновых кислот содержит сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце второй кодирующей последовательности; при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются, при этом ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для образования РНК-транскриптов, между сигнальной последовательностью донора сплайсинга на одном транскрипте и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг, тем самым образуя рекомбинированную молекулу РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не имеет последовательности интрона между двумя соседними экзонами.

Также в данном документе предложены композиции, которые содержат: первый вектор нуклеиновой кислоты, содержащий промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' промотора, сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и первый детектируемый маркерный ген, расположенный на 3' сигнальной последовательности донора сплайсинга; и второй вектор нуклеиновой кислоты, отличный от первого вектора нуклеиновой кислоты, включая второй детектируемый маркерный ген, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' второго детектируемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности; при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем соответствующие аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются друг с другом, причем ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для

образования РНК-транскриптов, между сигналом донора сплайсинга на одном транскрипте и сигналом акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг, тем самым формируя молекулу рекомбинированной РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не имеет последовательности интрона между двумя соседними экзонами. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый или второй детектируемый маркерный ген кодирует щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый и второй детектируемые маркерные гены являются одинаковыми.

Также в данном документе предложены композиции, которые содержат первый вектор нуклеиновой кислоты, содержащий промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную 3' к промотору, сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности и высокорекомбиногенную последовательность (например, рекомбиногенную область фага F1, например, SEQ ID NO: 66), расположенную 3' к сигнальной последовательности донора сплайсинга; и второй вектор нуклеиновой кислоты, отличный от первого вектора нуклеиновой кислоты, включая вторую высоко рекомбиногенную последовательность (например, рекомбиногенную область фага F1, например, SEQ ID NO: 67, или рекомбиногенную область щелочной фосфазы, например, SEQ ID NO: 89), сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' второй высоко рекомбиногенной последовательности (например, рекомбиногенной области фага F1 или рекомбиногенной области щелочной фосфазы), вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белок отоферлин, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности; при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем соответствующие аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются друг с другом, причем ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для образования РНК-транскриптов, между сигналом донора сплайсинга на одном транскрипте и сигналом акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг, тем самым образуя молекулу рекомбинированной РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов

содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не имеет последовательности интрона между двумя соседними экзонами.

В данном документе также предложены наборы, которые содержат любую из описанных в данном документе композиций. Некоторые варианты осуществления любого из описанных в данном документе наборов дополнительно включают предварительно заполненный шприц, содержащий композицию.

В данном документе также предложены способы, которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов ранее было идентифицировано, что млекопитающее имеет дефектный ген отоферлина.

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, которые включают введение любой из описанных в данном документе композиций в клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов ранее было определено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, которые включают введение в улитку терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов ранее было идентифицировано, что млекопитающее имеет дефектный ген отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов млекопитающее представляет собой человека.

В данном документе также предложены способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, которые включают введение терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект представляет собой человека. Некоторые варианты осуществления любого из описанных в данном документе способов дополнительно включают, до стадии введения, определение того, что у субъекта имеется дефектный ген отоферлина.

В данном документе представлены терапевтические композиции, содержащие множество векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем множество

векторов на основе AAV способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций множество векторов на основе AAV способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

Некоторые варианты осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций дополнительно содержат первый вектор на основе AAV и второй вектор на основе AAV, причем первый и второй векторы на основе AAV независимо имеют упаковочную способность менее около 6 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций матричная РНК полипептида слухового анализатора кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы отоферлина и его ортолога или гомолога.

Данные варианты осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций могут дополнительно содержать нуклеиновую кислоту (например, вектор), включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую матричную РНК полипептида слухового анализатора, которая кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы, состоящей из $Ca_v1.3$, каркасного белка, выбранного из Bassoon, Piccolo, Ribeye и гармонина, Vglut3, синаптоагмина, белка заякоривания/стыковки везикул, белка примирования везикул, белков слияния везикул, GluA2/3 и GluA4.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций первый вектор на основе AAV дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из промотора CBA, CMV или CB7.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций первый вектор на основе AAV дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из специфических для улитки промоторов.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций, терапевтическая композиция составлена для интракохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать полимерные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким

образом, чтобы содержать миникольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций терапевтическая композиция содержит раствор синтетической перилимфы. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция содержит раствор синтетической перилимфы, содержащий 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ CaCl₂; 1-10 мМ глюкозы; и 2-50 мМ HEPES; и имеющий pH от около 6 до около 9.

В данном документе также предложены терапевтические композиции, которые содержат матричную РНК полипептида слухового анализатора.

Также в данном документе предложены терапевтические композиции, которые содержат один или более векторов на основе аденовируса (AV), где один или более векторов на основе AV способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций один или более векторов на основе AV способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В данном документе также предложены терапевтические композиции, содержащие один или более лентивирусных векторов, причем один или более лентивирусных векторов способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций один или более лентивирусных векторов способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В данном документе также предложены хирургические методы, которые включают следующие стадии: i) осуществление в улитке субъекта-человека первого разреза в месте первого разреза; ii) введение внутрь улитки эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из терапевтических композиций, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов терапевтическую композицию вводят субъекту в место первого разреза. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов терапевтическую композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов терапевтическую композицию вводят субъекту к или через мембрану овального окна улитки. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном

документе способов терапевтическую композицию вводят субъекту в или через мембрану круглого окна улитки.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов терапевтическую композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов медицинское устройство содержит множество полых микроигл, по отдельности содержащих просвет, через который возможно переносить терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

В данном документе также предложены терапевтические системы доставки, которые содержат: i) медицинское устройство, способное создавать множество разрезов в мембране круглого окна внутреннего уха субъекта-человека, нуждающегося в этом, и ii) эффективную дозу терапевтической композиции, содержащей множество векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем множество векторов на основе AAV способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке внутреннего уха.

В данном документе также предложены средства для выполнения хирургического способа, который включает следующие стадии: i) введение внутрь улитки субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из описанных в данном документе терапевтических композиций), причем терапевтическую композицию можно вводить с помощью медицинского устройства, содержащего а) средства для создания множества разрезов в мембране круглого окна и б) эффективную дозу терапевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления любого из средств для выполнения хирургического способа, описанного в данном документе, медицинское устройство содержит множество микроигл.

В данном документе также предложены терапевтические композиции, которые содержат один вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем вектор на основе AAV способен образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций первый вектор на основе AAV способен образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке человека, которому вводят терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов один вектор (например, любой из описанных в данном документе векторов), который содержит последовательность, кодирующую активный белок отоферлин (например, любой из усеченных активных белков отоферлинов, описанных в данном документе), может быть введен субъекту.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция дополнительно содержит второй вектор, отличный от вектора на основе AAV, причем один вектор на основе AAV и второй вектор независимо имеют упаковочную способность менее около 6 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций матричная РНК полипептида слухового анализатора кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы отоферлина и его ортолога или гомолога.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций матричная РНК полипептида слухового анализатора кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы отоферлина и его усеченного мутанта.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций усеченный мутант отоферлина содержит по меньшей мере один домен C2 из следующего:

Домен C2	а.к. Обозначение (из Pangrsic et al. 2012 <i>Trends Neurosci</i> 35(11):671-680
C2A	1-121
C2B	256-378
C2C	419-542
C2D	962-1095
C2E	1494-1622
C2F	1734-1895

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций усеченный мутант отоферлина не содержит С-концевую область эндогенного полипептида отоферлина.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций матричная РНК полипептида слухового анализатора кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы, состоящей из Ca_v1.3, каркасного белка, выбранного из Bassoon, Piccolo, Ribeye и гармонина, Vglut3,

синаптотагмина, белка заякоривания/стыковки везикул, белка примирования везикул, белков слияния везикул, GluA2/3 и GluA4.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций первый вектор на основе AAV дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из промотора CBA, CMV или CB7.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций первый вектор на основе AAV дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из специфических для улитки промоторов.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций, терапевтическая композиция составлена для интракохлеарного введения.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать липидные наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать полимерные наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать миникольцевую ДНК.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы содержать ДНК CELiD.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций терапевтическая композиция содержит раствор синтетической перилимфы.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе терапевтических композиций, терапевтическая композиция содержит раствор синтетической перилимфы, содержащий 20-200 mM NaCl; 1-5 mM KCl; 0,1-10 mM CaCl₂; 1-10 mM глюкозы; 2-50 mM HEPES; имеющий pH от около 6 до около 9.

В данном документе также предложены терапевтические композиции, которые содержат матричную РНК полипептида слухового анализатора, кодирующую усеченный мутант отоферлина.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «элемент»

включает один элемент и более одного элемента.

Термин «около», используемый в отношении измеряемой величины, такой как количество, временная длительность и т.п., предназначен для охвата вариаций до $\pm 20\%$. Эти отклонения могут составлять, например, до $\pm 10\%$, или в некоторых случаях $\pm 5\%$, или в некоторых случаях $\pm 1\%$, или в некоторых случаях $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для выполнения описанные способы.

Термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Отоферлин считается сенсором кальция, необходимым для экзоцитоза внутренних волосковых клеток, а также высвобождения нейротрансмиттеров в незрелых наружных волосковых клетках. Пять из шести доменов C2 белка отоферлина (C2B-F) связывают ионы кальция с умеренными и низкими константами аффинности в растворе ($K_d=25-95$ мкМ и $400-700$ мкМ, соответственно) (Padmanarayana et al. 2014 *Biochem* 53:5023-5033). В присутствии фосфатидилсерина (PS) концентрация кальция 10 мкМ приводит к значительному взаимодействию C2-липосомы для доменов C2C-C2E отоферлина. Таким образом, отоферлин имеет домены, которые, по-видимому, функционируют, используя механизм «электростатического переключателя», а также домены, которые связываются независимо от кальция. PI (4,5) P2, основная сигнальная молекула в пресинапсе, как было показано, взаимодействует с доменами C2C и C2F отоферлина кальций-независимым образом (Padmanarayana et al. 2014 *Biochem* 53:5023-5033).

Как используется в данном документе, термин «антитело» относится к белку, или полипептидной последовательности, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, много- или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут представлять собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одной части интактного антитела или его рекомбинантных вариантов и относится к антигенсвязывающему домену, например, антигенной определяющей вариабельной области интактного антитела, которая достаточна для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты антител, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (VL или VH), домены VHH верблюда и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Термин «scFv» относится к гибриднему белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельные области легкой и тяжелой цепи непрерывно соединены посредством

короткого гибкого полипептидного линкера и способны быть экспрессированы как одноцепочечный полипептид, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Термин «рекомбинантный полипептид» относится к полипептиду, который получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, полипептид, экспрессируемый системой экспрессии вирусного вектора. Термин также следует воспринимать как обозначающий полипептид, который был получен путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей полипептид, и которая экспрессирует белок, или аминокислотной последовательности, определяющей полипептид, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области техники.

Термин «мутация в гене отоферлина» относится к модификации гена отоферлина дикого типа, которая приводит к продукции белка отоферлина, имеющего одно или более из: одной или более аминокислотных делеций, одной или более аминокислотных замен и одной или более аминокислотных вставок по сравнению с белком отоферлина дикого типа, и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка отоферлина в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка отоферлина в клетке млекопитающего, не имеющей мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к продукции белка отоферлина, имеющего делецию одной или более аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к сдвигу рамки считывания в гене отоферлина. Термин «сдвиг рамки считывания», как известно в данной области техники, охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления сдвиг рамки считывания может привести к образованию нефункционального белка. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация может быть нонсенс-мутацией (т.е. приводит к преждевременному стоп-кодону в экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к образованию усеченного белка (по сравнению с соответствующим белком дикого типа), который может быть функциональным или не функционировать. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК отоферлина или белка отоферлина, или как мРНК, так и белка. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к образованию измененного белка отоферлина, имеющего потерю или снижение одной или более биологических активностей (функций) по сравнению с белком отоферлина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одного

или более нуклеотидов в ген отоферлина. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной последовательности гена отоферлина, т.е. части гена, которая не является кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления мутация в регуляторной последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена отоферлина.

В нуклеотидную последовательность можно ввести модификации стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез.

Термин «консервативные модификации в последовательностях» относится к аминокислотным модификациям, которые в значительной степени не влияют и не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замещения, вставки и делеции. Модификации можно ввести в антитело или фрагмент антитела согласно изобретению стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные аминокислотные замещения - это такие замещения, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин и изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин).

Термин «кодирование» относится к неотъемлемому свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, такой как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза определенной последовательности аминокислот в соответствии с генетическим кодом. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, кДНК или РНК, продуцируют белок. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и, как правило, предоставляется в перечнях последовательностей, так и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции, может называться кодирующей белковый продукт.

Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две

молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих молекулах занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, в таком случае они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями прямо пропорциональна количеству совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях будет гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) будут совпадать или будут гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, также может включать интроны.

Термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы или образованному внутри них.

Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному извне или полученному вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая практически не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом связаны в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах эти клетки культивируются *in vitro*. В других аспектах эти клетки не культивируются *in vitro*.

Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка - это клетка, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную клетку субъекта и свое потомство.

Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

Как используется в настоящем документе, «временный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, причем период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине.

Термин «субъект» предназначен для включения живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие, человек). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна (например, крысу или мышь), кролика, овцу, собаку, кошку, лошадь, примата, не являющегося человеком, или человека. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется несиндромальная глухота или существует риск ее развития. В некоторых вариантах осуществления субъект был ранее идентифицирован как имеющий мутацию в гене отоферлина. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект был идентифицирован как имеющий мутацию в гене отоферлина, и ему был поставлен диагноз бессимптомная нейросенсорная потеря слуха. В некоторых вариантах осуществления субъект был идентифицирован как имеющий бессимптомную нейросенсорную потерю слуха.

Используемый в контексте данного документа термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Используемый в контексте данного документа термин «профилактика» означает предотвращение заболевания или болезненного состояния, или их профилактическое лечение. «Предотвращение» в этом контексте включает снижение вероятности того, что субъект переживет заболевание.

Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в данном документе, эффективному для достижения конкретного биологического результата.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество композиции может привести к увеличению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа или варианта белка отоферлина, обладающего желаемой активностью) (например, по сравнению с уровнем экспрессии до лечения композицией). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество композиции может привести к увеличению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, дикого типа, полноразмерного белка отоферлина или активного варианта) в целевой клетке (например, во внутренней волосковой клетке улитки). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество композиции может привести к другой клеточной локализации активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа

или его активного варианта) в целевой клетке (например, во внутренней волосковой клетке улитки). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество композиции может привести к увеличению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа или активного варианта) и/или увеличению одной или более активностей белка отоферлина в целевой клетке (например, по сравнению с эталонным уровнем, таким как уровень(-и) у субъекта до лечения, уровень(-и) у субъекта, имеющего мутацию в гене отоферлина, или уровень(-и) у субъекта или популяции субъектов с бессимптомной нейросенсорной потерей слуха).

Термин «парентеральное» введение композиции включает, например, подкожные (п/к), внутривенные (в/в), внутримышечные (в/м) или интратеральные инъекции или методы инфузии.

Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизирующиеся аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, замещения вырожденных кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещена на остатки смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе нуклеиновых кислот, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе нуклеиновых кислот, нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

В контексте данного изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

Используемый в контексте данного документа термин «транскрибированная *in vitro* РНК» относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. В целом, транскрибированную *in vitro* РНК получают из *in vitro* транскрипционного вектора. *In vitro* транскрипционный вектор содержит матрицу, которая используется для получения транскрибированной *in vitro* РНК.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и

относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Используемый в контексте данного документа этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

Термин «путь передачи сигнала» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор клеточной поверхности» включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через мембрану клетки.

Термин «активный белок отоферлин» означает белок, кодируемый ДНК, которая, если заменить оба аллеля дикого типа, кодирующие полноразмерный белок отоферлин в слуховых волосковых клетках (например, слуховых внутренних волосковых клетках) у млекопитающего, которое в противном случае относится к млекопитающему дикого типа, и если он экспрессируется в слуховых волосковых клетках этого млекопитающего, приводит к тому, что это млекопитающее имеет уровень слуха, приближающийся к нормальному уровню слуха аналогичного млекопитающего, которое является полностью диким типом. Неограничивающими примерами активных белков отоферлина являются полноразмерные белки отоферлина (например, любой из полноразмерных белков отоферлина, описанных в данном документе).

Например, активный белок отоферлина может содержать последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа (например, полноразмерный белок отоферлина дикого типа), включая от 1 аминокислотной замены до 240 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 235 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 230 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 225 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 220 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до 215 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до 210 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 205 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 200 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 195 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до около 190 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

замен, от около 210 аминокислотных замен до около 220 аминокислотных замен, от около 210 аминокислотных замен до около 215 аминокислотных замен, от около 215 аминокислотных замен до около 240 аминокислотных замен, от около 215 аминокислотных замен до около 235 аминокислотных замен, от около 215 аминокислотных замен до около 230 аминокислотных замен, от около 215 аминокислотных замен до около 225 аминокислотных замен, от около 215 аминокислотных замен до около 220 аминокислотных замен, от около 220 аминокислотных замен до около 240 аминокислотных замен, от около 220 аминокислотных замен до около 235 аминокислотных замен, от около 220 аминокислотных замен до около 230 аминокислотных замен, от около 220 аминокислотных замен до около 225 аминокислотных замен, от около 225 аминокислотных замен до около 240 аминокислотных замен, от около 225 аминокислотных замен до около 235 аминокислотных замен, от около 225 аминокислотных замен до около 230 аминокислотных замен, от около 230 аминокислотных замен до около 240 аминокислотных замен, от около 230 аминокислотных замен до около 235 аминокислотных замен. Специалист в данной области техники поймет, что аминокислоты, которые не являются консервативными для белков отоферлина дикого типа от разных видов, могут быть мутированы без потери активности, в то время как те аминокислоты, которые являются консервативными для белков отоферлина дикого типа от разных видов, не должны мутировать, поскольку они с большей вероятностью (чем аминокислоты, которые не являются консервативными у разных видов) будут вовлечены в активность.

Активный белок отоферлина может содержать, например, последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа (например, человеческий полноразмерный белок отоферлина дикого типа), который содержит от 1 аминокислоты до около 200 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 195 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 190 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 185 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 180 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 175 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 170 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 165 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 160 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 155 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 150 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 145 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 140 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 135 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 130 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 125 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 120 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 115 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 110 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 105 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 100 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 95 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 90 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 85 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 80 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 75 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 70 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 65 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 60 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 55 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 50 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 45 аминокислот, от 1 аминокислоты до около 40 аминокислот, от 1

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

аминокислот до около 185 аминокислот, от около 155 аминокислот до около 180
 аминокислот, от около 155 аминокислот до около 175 аминокислот, от около 155
 аминокислот до около 170 аминокислот, от около 155 аминокислот до около 165
 аминокислот, от около 155 аминокислот до около 160 аминокислот, от около 160
 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 195
 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 190 аминокислот, от около 160
 аминокислот до около 185 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 180
 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 175 аминокислот, от около 160
 аминокислот до около 170 аминокислот, от около 160 аминокислот до около 165
 аминокислот, от около 165 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 165
 аминокислот до около 195 аминокислот, от около 165 аминокислот до около 190
 аминокислот, от около 165 аминокислот до около 185 аминокислот, от около 165
 аминокислот до около 180 аминокислот, от около 165 аминокислот до около 175
 аминокислот, от около 165 аминокислот до около 170 аминокислот, от около 170
 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 170 аминокислот до около 195
 аминокислот, от около 170 аминокислот до около 190 аминокислот, от около 170
 аминокислот до около 185 аминокислот, от около 170 аминокислот до около 180
 аминокислот, от около 170 аминокислот до около 175 аминокислот, от около 175
 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 175 аминокислот до около 195
 аминокислот, от около 175 аминокислот до около 190 аминокислот, от около 175
 аминокислот до около 185 аминокислот, от около 175 аминокислот до около 180
 аминокислот, от около 180 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 180
 аминокислот до около 195 аминокислот, от около 180 аминокислот до около 190
 аминокислот, от около 180 аминокислот до около 185 аминокислот, от около 185
 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 185 аминокислот до около 195
 аминокислот, от около 185 аминокислот до около 190 аминокислот, от около 190
 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 190 аминокислот до около 195
 аминокислот, от около 195 аминокислот до около 200 аминокислот, которые удалены. В
 некоторых вариантах осуществления, где две или более аминокислоты удалены из
 последовательности полноразмерного белка отоферлина дикого типа, две или более
 удаленных аминокислот могут быть смежными в последовательности полноразмерного
 белка дикого типа. В других примерах, где две или более аминокислот удалены из
 последовательности полноразмерного белка отоферлина дикого типа, две или более
 удаленных аминокислот не являются смежными в последовательности полноразмерного
 белка дикого типа. Специалист в данной области техники должен понимать, что
 аминокислоты, которые не являются консервативными между полноразмерными белками
 отоферлина дикого типа из разных видов, могут быть удалены без потери активности, в то
 время как аминокислоты, которые являются консервативными между полноразмерными
 белками отоферлина дикого типа из разных видов не следует удалять, поскольку они с
 большей вероятностью (чем аминокислоты, которые не являются консервативными у

разных видов) вовлечены в активность.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления активный белок отоферлина может, например, содержать последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа, где от 1 аминокислоты до 50 аминокислот, от 1 аминокислоты до 45 аминокислот, от 1

[illegible]

аминокислот до 40 аминокислот, от около 7 аминокислот до 35 аминокислот, от около 7 аминокислот до 30 аминокислот, от около 7 аминокислот до 25 аминокислот, от около 7 аминокислот до 20 аминокислот, от около 7 аминокислот до 15 аминокислот, от около 7 аминокислот до 10 аминокислот, от около 7 аминокислот до 9 аминокислот, от около 8 аминокислот до 50 аминокислот, от около 8 аминокислот до 45 аминокислот, от около 8 аминокислот до 40 аминокислот, от около 8 аминокислот до 35 аминокислот, от около 8 аминокислот до 30 аминокислот, от около 8 аминокислот до 25 аминокислот, от около 8 аминокислот до 20 аминокислот, от около 8 аминокислот до 15 аминокислот, от около 8 аминокислот до 10 аминокислот, от около 10 аминокислот до 50 аминокислот, от около 10 аминокислот до 45 аминокислот, от около 10 аминокислот до 40 аминокислот, от около 10 аминокислот до 35 аминокислот, от около 10 аминокислот до 30 аминокислот, от около 10 аминокислот до 25 аминокислот, от около 10 аминокислот до 20 аминокислот, от около 10 аминокислот до 15 аминокислот, от около 15 аминокислот до 50 аминокислот, от около 15 аминокислот до 45 аминокислот, от около 15 аминокислот до 40 аминокислот, от около 15 аминокислот до 35 аминокислот, от около 15 аминокислот до 30 аминокислот, от около 15 аминокислот до 25 аминокислот, от около 15 аминокислот до 20 аминокислот, от около 20 аминокислот до 50 аминокислот, от около 20 аминокислот до 45 аминокислот, от около 20 аминокислот до 40 аминокислот, от около 20 аминокислот до 35 аминокислот, от около 20 аминокислот до 30 аминокислот, от около 20 аминокислот до 25 аминокислот, от около 25 аминокислот до 50 аминокислот, от около 25 аминокислот до 45 аминокислот, от около 25 аминокислот до 40 аминокислот, от около 25 аминокислот до 35 аминокислот, от около 25 аминокислот до 30 аминокислот, от около 30 аминокислот до 50 аминокислот, от около 30 аминокислот до 45 аминокислот, от около 30 аминокислот до 40 аминокислот, от около 30 аминокислот до 35 аминокислот, от около 35 аминокислот до 50 аминокислот, от около 35 аминокислот до 45 аминокислот, от около 35 аминокислот до 40 аминокислот, от около 40 аминокислот до 50 аминокислот, от около 40 аминокислот до 45 аминокислот, или от около 45 аминокислот до около 50 аминокислот, вставляют. В некоторых примерах вставленная аминокислота(-ы) может быть вставлена в виде непрерывной последовательности в последовательность полноразмерного белка дикого типа. В некоторых примерах аминокислота(-ы) не вставляется в виде непрерывной последовательности в последовательность полноразмерного белка дикого типа. Как можно понять из уровня техники, аминокислота(-ы) может быть вставлена в часть последовательности полноразмерного белка дикого типа, которая не является высококонсервативной у разных видов.

Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема данного изобретения. Соответствующим образом, описание диапазона следует считать таким, которое конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона.

Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать таким, которое конкретно раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. п.; а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как 95-99% идентичности, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, а также включает такие поддиапазоны, как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичности. Это применяется независимо от ширины диапазона.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в данной области техники, к которой относится данное изобретение. В данном документе описаны способы и материалы для применения в данном изобретении; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мутации в *OTOF* приводят к DFNB9, рецессивно наследуемому несиндромальному предъязыковому нарушению слуха. Дефицит отоферлина, белка, кодируемого *OTOF*, устраняет быстрый экзоцитоз из слуховых внутренних волосковых клеток (ВВК). Из-за нарушения нейротрансмиссии в первом слуховом синапсе звуковые сигналы не передаются в мозг, что объясняет глубокую глухоту.

Было обнаружено, что заявленные в настоящее время способы приводят к экспрессии полноразмерного отоферлина во внутренних слуховых волосковых клетках и успешно восстанавливают слух с порогами АСВП от 30 дБ до 70 дБ для щелчковых стимулов и от 50 дБ до 90 дБ для чистых тонов у нокаутных по отоферлину мышей. Ввиду этого открытия в данном документе предложены композиции и способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта (например, человека), идентифицированного как имеющий дефектный ген отоферлина.

В данном документе предложены композиции, которые содержат по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, где: каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, где каждая из кодируемых частей состоит из по меньшей мере 30 аминокислотных остатков в длину, при этом аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей; ни один вектор из по меньшей мере двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин); по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК

отоферлина, и не имеет последовательности интрона между двумя соседними экзонами; и при введении в клетку млекопитающего по меньшей мере два разных вектора подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, где рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). В некоторых примерах рекомбинированная нуклеиновая кислота, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин), присутствуют в виде эписомы в клетке млекопитающего (например, в любом из типов клеток млекопитающих, описанных в данном документе). Также предложены наборы, которые содержат любую из описанных в данном документе композиций. В данном документе также предложены способы, которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций.

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) в клетке млекопитающего, которые включают введение любой из описанных в данном документе композиций в клетку млекопитающего. В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. В данном документе также предложены способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, которые включают введение терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций в улитку субъекта.

Дополнительные неограничивающие аспекты композиций, наборов и способов описаны в данном документе и могут использоваться в любой комбинации без ограничения.

Отоферлин

К настоящему времени идентифицировано несколько сотен мутаций в гене *OTOF* человека, вызывающих глубокую предъязыковую глухоту DFNB9. Такие мутации являются причиной глухоты у 2-8% людей, рожденных с аутосомной, рецессивно наследуемой несиндромальной глухотой в разных популяциях (Rodríguez-Ballesteros et al. (2008) Hum. Mutat. 29 823-831; Choi et al. (2009) Clinical Genetics 75 237-243; Duman et al. (2011) Genet Test Mol Biomarkers 15 29-33; Varga et al. (2006) J Med Genet 43 576-581; Iwasa et al. (2013) BMC Med. Genet. 14 95). Например, две замены в экзоне 15 в положениях 490 и 515 в консервативном домене C2C отоферлина вызывают DFNB9 (Mirghomizadeh et al. (2002) Neurobiol. Dis. 10(2): 157-164). Migliosi et al. обнаружили новую мутацию Q829X в *OTOF* у испанских пациентов с предъязыковой несиндромальной потерей слуха (Migliosi et al. (2002) J. Med. Genet. 39(7): 502-506).

Дополнительные иллюстративные мутации в гене отоферлина, обнаруженные у субъектов с потерей слуха, и способы секвенирования нуклеиновой кислоты, кодирующей

отоферлин, описаны, например, в Rodriguez-Ballesteros et al. (2003) *Hum Mutat.* 22: 451-456; Wang et al. (2010) *BMC Med Genet.* 11:79; Yildirim-Baylan et al. (2014) *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol* 78: 950-953; Choi et al. (2009) *Clin. Genet.* 75(3): 237-243; и Marlin et al. (2010) *Biochem Biophys Res Commun* 394: 737-742.

Отоакустическая эмиссия пациентов с DFNB9 является нормальной по меньшей мере в течение первого десятилетия жизни, что указывает на морфологическую целостность внутреннего уха и правильное функционирование наружных волосковых клеток. Помимо отсутствия синаптической трансмиссии и последующей потери синапсов, морфология и физиология внутреннего уха сохраняется в DFNB9 по меньшей мере в течение первого десятилетия жизни человека.

Исследования на мышах показали, что синапсы структурно нормальны, а ВБК сохраняют нормальное количество синапсов у мышей в течение первой постнатальной недели. Между P6 и P15 теряется около половины синапсов (Roux et al. (2006) *Cell* 127 277-289). Животные модели позволили изучить влияние мутаций в отоферлине на синаптическую трансмиссию путем регистрации изменения емкости плазматической мембраны после слияния везикул и активности слухового нерва. У нокаутных по отоферлину (*Otof* ^{-/-}) мышей в ВБК почти не может быть запущен экзоцитоз за счет индуцированного деполяризацией притока Ca²⁺ через потенциалзависимые Ca²⁺ каналы (Roux et al. (2006) *Cell* 127 277-289). У мышей линии «пачанга» (англ.: *pachanga*) с глубоким нарушением слуха (*Otof*^{Pga/Pga}) со случайной точечной мутацией в домене C2F короткие (<10 мс) деполяризации ВБК вызвали слияние везикул такого же размера, как и у мышей дикого типа, однако длительная стимуляция выявила сильный дефицит в пополнении везикул в легко высвобождаемом пуле (Pangrsic et al. (2010) *Nat. Neurosci.* 13 869-876). Мутация p.Ile515Thr, обнаруженная у людей с незначительно повышенным порогом слуха, но с серьезным снижением понимания речи и температурно-зависимым оглушением (Varga et al. (2006) *J Med Genet* 43 576-581), выявила промежуточный фенотип при исследовании на мышинной модели (Strenzke et al. (2016) *EMBO J.* 35:2519-2535). Эти *Otof*^{I515T/I515T} мыши продемонстрировали умеренное повышение порогов слуха при оценке с помощью АСВП со снижением амплитуды волны I, но нормальные слуховые пороги в поведенческих тестах и регистрации отдельных единиц слухового нерва. Экзоцитоз RRP снова не нарушен, но устойчивый экзоцитоз снижен, хотя и не так сильно, как у *Otof*^{Pga/Pga}. В то время как у мышей дикого типа при комнатной температуре во время длительного стимулирования в каждой активной зоне в секунду могут сливаться 750 везикул, эта скорость падает до 350 везикул/с/активная зона у мышей *Otof*^{I515T/I515T} и до 200 везикул/с/активная зона в ВБК мышей *Otof*^{Pga/Pga} (Pangrsic et al. (2010) *Nat. Neurosci.* 13 869-876; Strenzke et al. (2016) *EMBO J.* 35 2519-2535). Это коррелировало с более низкими уровнями белка отоферлина на плазматической мембране ВБК, указывая на то, что количество отоферлина зависит от экзоцитоза и слуха (Strenzke et al. (2016) *EMBO J.* 35 2519-2535).

Способы обнаружения мутаций в гене хорошо известны в данной области. Неограничивающие примеры таких способов включают: полимеразную цепную реакцию в

реальном времени (ОТ-ПЦР), ПЦР, секвенирование, саузерн-блоттинг и нозерн-блоттинг.

Ген ОТОФ кодирует отоферлин, белок, который участвует в экзоцитозе синаптических везикул в волосковых клетках улитки (см., например, Johnson and Chapman (2010) *J. Cell Biol.* 191(1):187-198; и Heidrych et al. (2008) *Hum. Mol. Genet.* 17:3814-3821).

Ген ОТОФ человека расположен на хромосоме 2p23.3. Он содержит 48 экзонов, охватывающих ~ 132 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) (номер доступа NCBI NG009937.1). мРНК, кодирующая длинную форму отоферлина, экспрессируемую в головном мозге, содержит 48 экзонов (Yasunaga et al., *Am. J. Hum. Genet.* 67:591-600, 2000). Прямой и обратный праймеры, которые можно использовать для амплификации каждого из 48 экзонов гена ОТОФ, описаны в таблице 2 из Yasunaga et al., *Am. J. Hum. Genet.* 67:591-600, 2000. В некоторых примерах полноразмерный белок ОТОФ представляет собой полноразмерный белок ОТОФ дикого типа. Полноразмерный белок ОТОФ дикого типа, экспрессируемый из гена ОТОФ человека, имеет длину 1997 остатков.

Иллюстративный человеческий белок отоферлин дикого типа представляет собой или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5. Изоформа е белка отоферлина человека (SEQ ID NO: 5) кодируется мРНК, которая содержит экзон 48 и не содержит экзон 47 гена отоферлина (Yasunaga et al., *Am. J. Hum. Genet.* 67:591-600, 2000). В некоторых вариантах осуществления активный белок отоферлин имеет последовательность SEQ ID NO: 5, но в нем отсутствуют 20 аминокислот, включая мотив RXR, идентифицированный в Strenzke et al., *EMBO J.* 35(23):2499-2615, 2016). Неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, кодирующих белок отоферлин дикого типа, представляют собой или содержат любую из SEQ ID NO: 7-11. Как можно понять из уровня техники по меньшей мере некоторые или все кодоны в SEQ ID NO: 7-11 могут быть оптимизированы по кодонам для обеспечения оптимальной экспрессии у млекопитающего, не являющегося человеком, или у человека. В данной области техники известны ортологи белков отоферлина.

Последовательности кДНК белка отоферлина человека:

Последовательность человеческой канонической (длинной) изоформы (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 1) (также называемая изоформой а отоферлина) (номер доступа NCBI AAD26117.1)

Человеческая изоформа 2 (короткая 1) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 2) (также называемая изоформой d отоферлина) (номер доступа NCBI NP_919304.1)

Человеческая изоформа 3 (короткая 2) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 3) (также называемая изоформой с отоферлина) (номер доступа NP_919303.1)

Человеческая изоформа 4 (короткая 3) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 4) (также называемая изоформой b отоферлина) (номер доступа NP_004793.2)

Человеческая изоформа 5 (короткая 4) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 5) (также называемая изоформой e отоферлина) (номер доступа NP_001274418.1)

Полная cds (кДНК отоферлина) (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF107403.1) (SEQ ID NO: 6) (кодирует белок SEQ ID NO: 1)

Вариант	1	транскрипта	отоферлина	человека
----------------	----------	--------------------	-------------------	-----------------

(www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_194248.2) (SEQ ID NO: 7) (кодирует белок SEQ ID NO: 1)

Вариант 2 транскрипта отоферлина человека
(www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004802.3) (SEQ ID NO: 8) (кодирует белок SEQ ID NO: 4)

Вариант 3 транскрипта отоферлина человека
(www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_194322.2) (SEQ ID NO: 9) (кодирует белок SEQ ID NO: 3)

Вариант 4 транскрипта отоферлина человека
(www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_194323.2) (SEQ ID NO: 10) (кодирует белок SEQ ID NO: 2)

Вариант 5 транскрипта отоферлина человека
(www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001287489.1) (SEQ ID NO: 11) (кодирует белок SEQ ID NO: 5)

Неограничивающим примером последовательности геномной ДНК отоферлина человека дикого типа является SEQ ID NO: 12. Экзоны в SEQ ID NO: 12: положения нуклеотидов 5001-5206 (экзон 1), положения нуклеотидов 25925-25983 (экзон 2), положения нуклеотидов 35779-35867 (экзон 3), положения нуклеотидов 44590-44689 (экзон 4), положения нуклеотидов 47100-47281 (экзон 5), положения нуклеотидов 59854-59927 (экзон 6), положения нуклеотидов 61273-61399 (экзон 7), положения нуклеотидов 61891-61945 (экзон 8), положения нуклеотидов 68626-68757 (экзон 9), положения нуклеотидов 73959-74021 (экзон 10), положения нуклеотидов 74404-74488 (экзон 11), положения нуклеотидов 79066-79225 (экзон 12), положения нуклеотидов 80051-80237 (экзон 13), положения нуклеотидов 81107-81293 (экзон 14), положения нуклеотидов 82690-82913 (экзон 15), положения нуклеотидов 83388-83496 (экзон 16), положения нуклеотидов 84046-84226 (экзон 17), положения нуклеотидов 84315-84435 (экзон 18), положения нуклеотидов 85950-86050 (экзон 19), положения нуклеотидов 86193-86283 (экзон 20), положения нуклеотидов 86411-86527 (экзон 21), положения нуклеотидов 86656-86808 (экзон 22), положения нуклеотидов 87382-87571 (экзон 23), положения нуклеотидов 87661-87785 (экзон 24), положения нуклеотидов 88206-88340 (экзон 25), положения нуклеотидов 89025-89186 (экзон 26), положения нуклеотидов 89589-89708 (экзон 27), положения нуклеотидов 90132-90293 (экзон 28), положения нуклеотидов 90405-90567 (экзон 29), положения нуклеотидов 91050-91180 (экзон 30), положения нуклеотидов 92549-92578 (экзон 31), положения нуклеотидов 92978-93106 (экзон 32), положения нуклеотидов 95225-95291 (экзон 33), положения нуклеотидов 96198-96334 (экзон 34), положения нуклеотидов 96466-96600 (экзон 35), положения нуклеотидов 96848-96985 (экзон 36), положения нуклеотидов 97623-97750 (экзон 37), положения нуклеотидов 97857-98027 (экзон 38), положения нуклеотидов 98670-98830 (экзон 39), положения нуклеотидов 99593-99735 (экзон 40), положения нуклеотидов 100128-100216 (экзон 41), положения нуклеотидов 101518-101616 (экзон 42), положения нуклеотидов 101762-102003 (экзон 43), положения нуклеотидов

102669-102847 (экзон 44), положения нуклеотидов 102952-103052 (экзон 45), положения нуклеотидов 103494-103691 (экзон 46), положения нуклеотидов 105479-106496 (экзон 47), и экзон 48 (последовательность, начинающаяся с CCGGCCCGAC; см. также описание этого экзона в Yasunaga et al., *Am. J. Hum. Genet.* 67:591-600, 2000).

Интроны расположены между каждой смежной парой экзонов в SEQ ID NO: 12, то есть в положениях нуклеотидов 100-5001 (интрон 1), нуклеотидах 5207-25924 (интрон 2), положениях нуклеотидов 25984-35778 (интрон 3), положениях нуклеотидов 35868-44589 (интрон 4), положениях нуклеотидов 44690-47099 (интрон 5), положениях нуклеотидов 47282-59853 (интрон 6), положениях нуклеотидов 59928-61272 (интрон 7), положениях нуклеотидов 61400-61890 (интрон 8), положениях нуклеотидов 61946-68625 (интрон 9), положениях нуклеотидов 68758-73958 (интрон 10), положениях нуклеотидов 74022-74403 (интрон 11), положениях нуклеотидов 74489-79065 (интрон 12), положениях нуклеотидов 79226-80050 (интрон 13), положениях нуклеотидов 80238-81106 (интрон 14), положениях нуклеотидов 81294-82689 (интрон 15), положениях нуклеотидов 82914-83387 (интрон 16), положениях нуклеотидов 83497-84045 (интрон 17), положениях нуклеотидов 84227-84314 (интрон 18), положениях нуклеотидов 84436-85949 (интрон 19), положениях нуклеотидов 86051-86192 (интрон 20), положениях нуклеотидов 86284-86410 (интрон 21), положениях нуклеотидов 86528-86655 (интрон 22), положениях нуклеотидов 86809-87381 (интрон 23), положениях нуклеотидов 87572-87660 (интрон 24), положениях нуклеотидов 87786-88205 (интрон 25), положениях нуклеотидов 88341-89024 (интрон 26), положениях нуклеотидов 89187-89588 (интрон 27), положениях нуклеотидов 89709-90131 (интрон 28), положениях нуклеотидов 90294-90404 (интрон 29), положениях нуклеотидов 90568-91049 (интрон 30), положениях нуклеотидов 91181-92548 (интрон 31), положениях нуклеотидов 92579-92977 (интрон 32), положениях нуклеотидов 93107-95224 (интрон 33), положениях нуклеотидов 95292-96197 (интрон 34), положениях нуклеотидов 96335-96465 (интрон 35), положениях нуклеотидов 96601-96847 (интрон 36), положениях нуклеотидов 96986-97622 (интрон 37), положениях нуклеотидов 97751-97856 (интрон 38), положениях нуклеотидов 98028-98669 (интрон 39), положениях нуклеотидов 98831-99592 (интрон 40), положениях нуклеотидов 99736-100127 (интрон 41), положениях нуклеотидов 100217-101517 (интрон 42), положениях нуклеотидов 101617-101761 (интрон 43), положениях нуклеотидов 102004-102668 (интрон 44), положениях нуклеотидов 102848-102951 (интрон 45), положениях нуклеотидов 103053-103494 (интрон 46), положениях нуклеотидов 103692-105478 (интрон 47), и положениях нуклеотидов 106497-108496 (интрон 48).

Последовательность гена отоферлина человека
(ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224465243) (SEQ ID NO: 12)

Белок отоферлин мыши (SEQ ID NO: 13) (номер доступа NCBI NP_001300696.1)

кДНК отоферлина мыши (SEQ ID NO: 14) (номер доступа NCBI NM_001313767.1)

Последовательность гена отоферлина человека
(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83762) (SEQ ID NO: 15) доступ: NC_000071 ОБЛАСТЬ: комплемент (30367066..30462730) GPC_000000778; эталонная последовательность NCBI:

NC_000071.6

Последовательность гена отоферлина А данио-рерио
(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/557476) (SEQ ID NO: 16) ДОСТУП NC_007131 ОБЛАСТЬ:
31173357..31310109 GPC_000001574 Эталонная последовательность NCBI: NC_007131.7

Последовательность гена отоферлина макака-резуса
(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/696717) (SEQ ID NO: 17) ДОСТУП NC_027905 ОБЛАСТЬ:
комплемент (26723411..26826586) GPC_000002105, эталонная последовательность NCBI:
NC_027905.1

Последовательность гена отоферлина собаки (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/607961)
(SEQ ID NO: 18) ДОСТУП NC_006599 ОБЛАСТЬ: комплемент (20518502..20619461)
GPC_000000676, эталонная последовательность NCBI: NC_006599.3

Последовательность гена отоферлина шимпанзе
(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/459083) (SEQ ID NO: 19) ДОСТУП NC_006469 ДОСТУП:
комплемент (27006052..27107747) GPC_000002338, эталонная последовательность NCBI:
NC_006469.4

Белок отоферлин крысы (SEQ ID NO: 20)

Белок отоферлин данио-рерио (SEQ ID NO: 21)

Белок отоферлин коровы (SEQ ID NO: 22)

Белок отоферлин бабуина (SEQ ID NO: 23)

Последовательность ДНК 5'mOTOF (SEQ ID NO: 94)

ATGGCCCTGATTGTTACCTCAAGACTGTCTCAGAGCTCCGAGGCAAAGGTG
ACCGGATTGCCAAAGTCACTTTCCGAGGGCAGTCTTTCTACTCCCGGGTCCTGGAGA
ACTGCGAGGGTGTGGCTGACTTTGATGAGACGTTCCGGTGGCCAGTGGCCAGCAGC
ATCGACCGGAATGAAGTGTTGGAGATTCAGATTTTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGC
AACAAGCTGATAGGGACCTTCTGCATGGTGCTGCAGAAAGTGGTGGAGGAGAATCG
GGTAGAGGTGACCGACACGCTGATGGATGACAGCAATGCTATCATCAAGACCAGCC
TGAGCATGGAGGTCCGGTATCAGGCCACAGATGGCACTGTGGGCCCCCTGGGATGAT
GGAGACTTCCTGGGAGATGAATCCCTCCAGGAGGAGAAGGACAGCCAGGAGACAG
ATGGGCTGCTACCTGGTTCCCGACCCAGCACCCGGATATCTGGCGAGAAGAGCTTTC
GCAGAGCGGGAAGGAGTGTGTTCTCGGCCATGAACTCGGCAAACTCGGTCCCAC
AAAGAGGAGCCCCAAAGACAAGATGAGCCAGCAGTGCTGGAGATGGAGGACCTGG
ACCACCTAGCCATTTCAGCTGGGGGATGGGCTGGACCCTGACTCCGTGTCTCTAGCCT
CGGTCACCGCTCTCACCAGCAATGTCTCCAACAACGGTCTAAGCCAGATATTAAGA
TGGAGCCCAGTGCTGGAAGGCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCACAGTGATTGAG
GCTCGGCAGCTGGTGGGCTTGAACATGGACCCTGTGGTGTGTGTGGAGGTGGGTGA
TGACAAGAAATACACGTCAATGAAGGAGTCCACAAACTGCCCTTACTACAACGAGT
ACTTTGTCTTCGACTTCCATGTCTCTCCTGATGTCATGTTTGACAAGATCATCAAGAT
CTCGGTTATCCATTCTAAGAACCTGCTTCGGAGCGGCACCCTGGTGGGTTCCTTCAA
AATGGATGTGGGGACTGTGTATTCCAGCCTGAACACCAGTTCATCACAATGGGC
CATCCTGTCAGACCCCGATGACATCTCTGCTGGGTGAAGGGTTATGTAAAGTGTGA

TGTCGCTGTGGTGGGCAAGGGAGACAACATCAAGACACCCCACAAGGCCAACGAGA
 CGGATGAGGACGACATTGAAGGGAACCTTGCTGCTCCCCGAGGGCGTGCCCCCGAA
 CGGCAGTGGGCACGGTTCTATGTGAAAATTTACCGAGCAGAGGGGACTGCCCCGGAT
 GAACACAAGCCTCATGGCCAACGTGAAGAAGGCGTTCATCGGTGAGAACAAGGACC
 TCGTCGACCCCTATGTGCAAGTCTTCTTTGCTGGACAAAAGGGCAAAACATCAGTGC
 AGAAGAGCAGCTATGAGCCGCTATGGAATGAGCAGGTCGTCTTCACAGACTTGTTT
 CCCCCACTCTGCAAACGCATGAAGGTGCAGATCCGGGACTCTGACAAGGTCAATGA
 TGTGGCCATCGGCACCCACTTCATCGACCTGCGCAAGATTTCCAACGATGGAGACAA
 AGGCTTCCTGCCTACCCCTCGGTCCAGCCTGGGTGAACATGTACGGCTCCACGCGCAA
 CTACACACTGCTGGACGAGCACCAGGACTTGAATGAAGGCCTGGGGGAGGGTGTGT
 CCTTCCGGGCCCCGCCTCATGTTGGGACTAGCTGTGGAGATCCTGGACACCTCCAACC
 CAGAGCTCACCAGCTCCACGGAGGTGCAGGTGGAGCAGGCCACGCCTGTCTCGGAG
 AGCTGCACAGGGAGAATGGAAGAATTTTTTCTATTTGGAGCCTTCTTGGAAGCCTCA
 ATGATTGACCGGAAAAATGGGGACAAGCCAATTACCTTTGAGGTGACCATAGGAAA
 CTACGGCAATGAAGTCGATGGTATGTCCCGGCCCTGAGGCCTCGGCCCCGGAAAG
 AGCCTGGGGATGAAGAAGAGGTAGACCTGATTCAGAACTCCAGTGACGATGAAGGT
 GACGAAGCCGGGGACCTGGCCTCGGTGTCTCCACCCACCTATGCGGCCCCAGATC
 ACGGACAGGAACTATTTCCACCTGCCCTACCTGGAGCGCAAGCCCTGCATCTATATC
 AAGAGCTGGTGGCCTGACCAGAGGCGGCGCCTCTACAATGCCAACATCATGGATCA
 CATTGCTGACAAGCTGGAAGAAGGCCTGAATGATGTACAGGAGATGATCAAAACGG
 AGAAGTCCTACCCGGAGCGCCGCCTGCGGGGTGTGCTAGAGGAACTCAGCTGTGGC
 TGCCACCGCTTCCTCTCCCTCTCGGACAAGGACCAGGGCCGCTCGTCCCGCACCAGG
 CTGGATCGAGAGCGTCTTAAGTCCTGTATGAGGGAGTTGGAGAGCATGGGACAGCA
 GGCCAAGAGCCTGAGGGCTCAGGTGAAGCGGCACACTGTTCGGGACAAGCTGAGGT
 CATGCCAGAACTTTCTGCAGAAGCTACGCTTCCTGGCGGATGAG

Последовательность ДНК 3' mOTOF (SEQ ID NO: 95)

CCCCAGCACAGCATTCCGGATGTGTTTCATTTGGATGATGAGCAACAACAAAC
 GTATCGCCTATGCCCCGCGTGCCTTCCAAAGACCTGCTCTTCTCCATCGTGGAGGAGG
 AACTGGGCAAGGACTGCGCCAAAGTCAAGACCCTCTTCCTGAAGCTGCCAGGGGAAG
 AGGGGCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGTACAGGCCAAGCTGGAGCTCTACCTGTG
 GCTGGGCCTCAGCAAGCAGCGAAAGGACTTCCTGTGTGGTCTGCCCTGTGGCTTCGA
 GGAGGTCAAGGCAGCCCAAGGCCTGGGCCTGCATTCCTTTCCGCCCATCAGCCTAGT
 CTACACCAAGAAGCAAGCCTTCCAGCTCCGAGCACACATGTATCAGGCCCCGAAGCC
 TCTTTGCTGCTGACAGCAGTGGGCTCTCTGATCCCTTTGCCCGTGTCTTCTTCATCAA
 CCAGAGCCAATGCACTGAGGTTCTAAACGAGACACTGTGTCCCACCTGGGACCAGA
 TGCTGGTATTTGACAACCTGGAGCTGTACGGTGAAGCTCACGAGTTACGAGATGATC
 CCCCCATCATTGTCATTGAAATCTACGACCAGGACAGCATGGGGCAAAGCCGACTTCA
 TGGGCCGGACCTTCGCCAAGCCCCTGGTGAAGATGGCAGATGAAGCATACTGCCCA
 CCTCGCTTCCCGCCGAGCTTGAGTACTACCAGATCTACCGAGGCAGTGCCACTGCC
 GGAGACCTACTGGCTGCCTTCGAGCTGCTGCAGATTGGGCCATCAGGGAAGGCTGA

CCTGCCACCCATCAATGGCCCAGTGGACATGGACAGAGGGCCCATCATGCCTGTGC
CCGTGGGAATCCGGCCAGTGCTCAGCAAGTACCGAGTGGAGGTGCTGTTCTGGGGC
CTGAGGGACCTAAAGAGGGGTGAACCTGGCCCAGGTGGACCGACCACGGGTGGACAT
CGAGTGTGCAGGAAAGGGGGTACAATCCTCCCTGATTACAATTATAAGAAGAACC
CCAACTTCAACACGCTGGTCAAGTGGTTTGAAGTGGACCTCCCGGAGAATGAGCTCC
TGCACCCACCCTTGAACATCCGAGTGGTAGATTGCCGGGCCTTTGGACGATACACCC
TGGTGGGTTCACGACGTCAGCTCACTGAGGCGCTTCATCTACCGACCTCCAGACC
GCTCAGCCCCCAACTGGAACACCACAGGGGAGGTTGTAGTAAGCATGGAGCCTGAG
GAGCCAGTTAAGAAGCTGGAGACCATGGTGAAACTGGATGCGACTTCTGATGCTGT
GGTCAAGGTGGATGTGGCTGAAGATGAGAAGGAAAGGAAGAAGAAGAAAAAGAAA
GGCCCGTCAGAGGAGCCAGAGGAGGAAGAGCCCGATGAGAGCATGCTGGATTGGT
GGTCCAAGTACTTCGCCTCCATCGACACAATGAAGGAGCAACTTCGACAACATGAG
ACCTCTGGAAGTACTTGGAAAGAGAAGGAAGAGATGGAAAGCGCTGAGGGCCTGA
AGGGACCAATGAAGAGCAAGGAGAAGTCCAGAGCTGCAAAGGAGGAGAAAAAGA
AGAAAAACCAGAGCCCTGGCCCTGGCCAGGGATCGGAGGCTCCTGAGAAGAAGAA
AGCCAAGATCGATGAGCTTAAGGTGTACCCCAAGGAGCTGGAATCGGAGTTTGACA
GCTTTGAGGACTGGCTGCACACCTTCAACCTGTTGAGGGGCAAGACGGGAGATGAT
GAGGATGGCTCCACAGAGGAGGAGCGCATAGTAGGCCGATTCAAGGGCTCCCTCTG
TGTGTACAAAGTGCCACTCCCAGAAGATGTATCTCGAGAAGCTGGCTATGATCCAC
CTATGGAATGTTCCAGGGCATCCCAAGCAATGACCCCATCAATGTGCTGGTCCGAAT
CTATGTGGTCCGGGCCACAGACCTGCACCCGGCCGACATCAATGGCAAAGCTGACC
CCTATATTGCCATCAAGTTAGGCAAGACCGACATCCGAGACAAGGAGAACTACATC
TCCAAGCAGCTCAACCCTGTGTTTGGGAAGTCCTTTGACATTGAGGCCTCCTTCCCC
ATGGAGTCCATGTTGACAGTGGCCGTGTACGACTGGGATCTGGTGGGCACTGATGA
CCTCATCGGAGAAACCAAGATTGACCTGGAAAACCGCTTCTACAGCAAGCATCGCG
CCACCTGCGGCATCGCACAGACCTATTCCATACATGGCTACAATATCTGGAGGGACC
CCATGAAGCCCAGCCAGATCCTGACACGCCTCTGTAAAGAGGGCAAAGTGGACGGC
CCCCACTTTGGTCCCCATGGGAGAGTGAGGGTTGCCAACCGTGTCTTCACGGGGCCT
TCAGAAATAGAGGATGAGAATGGTCAGAGGAAGCCACAGATGAGCACGTGGCAC
TGTCTGCTCTGAGACACTGGGAGGACATCCCCCGGGTGGGCTGCCGCCTTGTGCCGG
AACACGTGGAGACCAGGCCGCTGCTCAACCCTGACAAGCCAGGCATTGAGCAGGGC
CGCCTGGAGCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGGACATGCCAGCCCCTGGGACACCT
CTGGATATATCCCCCAGGAAACCAAGAAGTACGAGCTGCGGGTCATCGTGTGGAA
CACAGACGAGGTGGTCCTGGAAGACGATGATTTCTTCACGGGAGAGAAGTCCAGTG
ACATTTTTGTGAGGGGGTGGCTGAAGGGCCAGCAGGAGGACAAACAGGACACAGAT
GTCCACTATCACTCCCTCACGGGGGAGGGCAACTTCAACTGGAGATACCTCTTCCCC
TTCGACTACCTAGCGGCCGAAGAGAAGATCGTTATGTCCAAAAGGAGTCTATGTTT
TCCTGGGATGAGACGGAGTACAAGATCCCTGCGCGGCTCACCTGCAGATCTGGGA
CGCTGACCACTTCTCGGCTGACGACTTCCTGGGGGCTATCGAGCTGGACCTGAACCG
GTTCCCGAGGGGCGCTAAGACAGCCAAGCAGTGCACCATGGAGATGGCCACCGGGG

AGGTGGACGTACCCCTGGTTTCCATCTTTAAACAGAAACGTGTCAAAGGCTGGTGGC
 CCCTCCTGGCCCGCAATGAGAATGATGAGTTTGAGCTCACAGGCAAAGTGGAGGCG
 GAGCTACACCTACTCACGGCAGAGGAGGCAGAGAAGAACCCTGTGGGCCTGGCTCG
 CAATGAACCTGATCCCCTAGAAAAACCCAACCGGCCTGACACGGCATTCGTCTGGTT
 CCTGAACCCACTCAAATCTATCAAGTACCTCATCTGCACCCGGTACAAGTGGCTGAT
 CATCAAGATCGTGCTGGCGCTGCTGGGGCTGCTCATGCTGGCCCTCTTCCTTTACAG
 CCTCCCAGGCTACATGGTCAAGAAGCTCCTAGGGGCCTGA

Некоторые варианты осуществления любой из описанных в данном документе композиций могут содержать первый вектор, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO: 94 (или содержать последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 94). Некоторые варианты осуществления любой из описанных в данном документе композиций могут содержать первый вектор, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO: 95 (или содержать последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 95).

Векторы

В данном документе предложены композиции веществ и способы применения для лечения такого заболевания, как несиндромальная потеря слуха, с использованием терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот, таких как матричные РНК полипептида слухового анализатора. Предпочтительно, нуклеиновые кислоты полипептида слухового анализатора присутствуют в вирусных векторах, таких как векторы на основе аденоассоциированного вируса, аденовирусные векторы, лентивирусные векторы и ретровирусные векторы.

Вышеупомянутые способы упаковки рекомбинантных векторов в желаемые капсиды AAV для получения rAAV по данному изобретению не предназначены для ограничения, и для квалифицированного специалиста будут очевидны другие подходящие способы.

Регулирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, последовательности терминирования транскрипции, последовательности промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли(А)); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; а также при желании последовательности, которые повышают секрецию кодируемого

продукта. Большое количество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифическими, известны в данной области техники и могут быть использованы.

В данном контексте последовательность нуклеиновой кислоты (например, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности называются «функционально» связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция последовательности нуклеиновой кислоты осуществлялись под влиянием или контролем регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательности нуклеиновых кислот транслировались в функциональный белок, две последовательности ДНК считаются функционально связанными, если индукция промотора в 5'-регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя последовательностями ДНК не (1) приводит к введению мутации со сдвигом рамки считывания, (2) не влияет на способность промоторной области направлять транскрипцию кодирующих последовательностей или (3) не влияет на способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок. Таким образом, промоторная область была бы функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы промоторная область была способна влиять на транскрипцию этой последовательности ДНК, так что полученный транскрипт мог бы транслироваться в желаемый белок или полипептид. Точно так же две или более кодирующих областей функционально связаны, когда они связаны таким образом, что их транскрипция с общего промотора приводит к экспрессии двух или более белков, транслированных в рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления функционально связанные кодирующие последовательности дают слитый белок. В некоторых вариантах осуществления функционально связанные кодирующие последовательности дают функциональную РНК (например, кшРНК, миРНК, ингибитор миРНК).

Для нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность полиаденилирования, как правило, встраивают после последовательностей трансгена и перед последовательностью ITR 3' AAV. Конструкт rAAV, используемый в данном изобретении, может также содержать интрон, желательно расположенный между последовательностью промотора/энхансера и трансгеном. Одна возможная последовательность интрона происходит от SV-40 и называется последовательностью Т-интрона SV-40. Другой векторный элемент, который может быть использован, представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена. Последовательность IRES будет использоваться для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других общих векторных элементов является традиционным, и доступны многие подобные последовательности. [см., например, Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989), а также ссылки, цитируемые в нем, например, на страницах

3.18 3.26 и 16.17 16.27, и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В некоторых вариантах осуществления последовательность вируса ящура 2A включена в полипротеин; это небольшой пептид (около 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; and Halpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459). Активность расщепления последовательности 2A ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и векторы для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., *Human Gene Therapy*, 2000; 11: 1921-1931; и Klump, H et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 811-817).

Точная природа регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов в клетках-хозяевах, может варьироваться между видами, тканями или типами клеток, но в целом должна включать, при необходимости, 5'-нетранскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ, энхансерные элементы и т.п. В частности, такие 5'-нетранскрибируемые регуляторные последовательности будут содержать промоторную область, которая включает последовательность промотора для транскрипционного контроля функционально присоединенного гена. Регуляторные последовательности могут также включать последовательности энхансера или активирующие последовательности, если необходимо. Векторы согласно изобретению могут необязательно включать 5'-лидерные или сигнальные последовательности. Выбор и дизайн подходящего вектора находится в пределах компетенции и усмотрения специалиста в данной области техники.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, ретровирусный LTR-промотор из вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., например, Boshart et al. (1985) *Cell*, 41:521-530], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) (Gilham et al., *J. Gene Med.* 12(2):129-136, 2010), и промотор EF1-альфа [Invitrogen].

Индукцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индукцибельные промоторы и индукцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми соединениями, включают

индуцируемый цинком промотор овечьего металлотионина (MT), промотор дексаметазон (Dex) -индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351), тетрациклин-репресслируемая система (Gossen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклином-индуцируемая система (Gossen et al. *Science*, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), RU486-индуцируемую систему (Wang et al. *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) и Wang et al. *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) и рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al. *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Другими типами индуцибельных промоторов, которые могут использоваться в данном контексте, являются те, которые регулируются с помощью специфического физиологического состояния, например температуры, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках.

В другом варианте осуществления для трансгена будет использоваться нативный промотор. Нативный промотор может быть предпочтительным, если желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, когда экспрессия трансгена должна регулироваться во времени или в процессе развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. В дополнительном варианте осуществления другие элементы контроля нативной экспрессии, такие как элементы энхансера, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак, также могут быть использованы для имитации нативной экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные последовательности обеспечивают тканеспецифическую экспрессию генов. В некоторых случаях тканеспецифические регуляторные последовательности связывают тканеспецифические факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом. Такие тканеспецифические регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Примеры тканеспецифических регуляторных последовательностей включают, но не ограничиваются ими, следующие тканеспецифические промоторы: печеночно-специфический промотор тироксинсвязывающего глобулина (TBG), инсулиновый промотор, промотор глюкагона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn) (Kugler et al., *Virology* 311:89-95, 2003; Hioki et al., *Gene Ther.* 14:872-882, 2007; Kuroda et al., *J. Gene Med.* 10:1163-1175, 2008), промотор креатинкиназы (MCK) (Wang et al., *Gene Ther.* 15:1489-1499, 2008; Talbot et al., *Mol. Ther.* 18:601-608, 2010; Katwal et al., *Gene Ther.* 20(9):930-938, 2013), промотор десмина млекопитающего (DES) (Talbot et al., *Mol. Ther.* 18:601-608, 2010), промотор C5-12 (Wang et al., *Gene Ther.* 15:1489-1499, 2008), промотор тяжелой цепи α -миозина (α -MHC), промотор PDGF (Paterna, *Gene Ther.* 7(15):1304-1311, 2000; Hioki et al., *Gene Ther.* 14:872-882, 2007), промотор MecP2 (Rastegar et al., *PLoS One* 4:e6810, 2009; Gray et al., *Human Gene Ther.* 22:1143-1153, 2011), промотор

CaMKII (Hioki et al., *Gene Ther.* 14:872-882, 2007; Kuroda et al., *J. Gene Med.* 10:1163-1175, 2008), промотор mGluR2 (Brene et al., *Eur. J. Neurosci.* 12:1525-1533, 2000; Kuroda et al., *J. Gene Med.* 10:1163-1175, 2008), промотор NFL (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор NFH (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор n $\square$ 2 (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор PPE (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор Enk (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор EAAT2 (Su et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:1955-1960, 2003; Kuroda et al., *J. Gene Med.* 10:1163-1175, 2008), промотор GFAP (Brenner et al., *J. Neurosci.* 14:1030-1037, 1994; Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001; Lee et al., *Glia* 56:481-493, 2008; Dirren et al., *Human Gene Ther.* 25:109-120, 2014), промотор MBP (Chen et al., *Gene Ther.* 5(1):50-58, 1998), или промотор сердечного тропонина Т (сTnT). Другие иллюстративные промоторы включают промотор бета-актина, основной промотор вируса гепатита В, Sandig et al., *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); промотор альфа-фетопroteина (AFP), Arbuthnot et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)), промотор остеокальцина костей (Stein et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); промотор сиалопротеина костей (Chen et al., *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)), промотор CD2 (Hansal et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина; промотор альфа-цепи рецептора Т-клеток, нейрональный промотор, такой как промотор нейрон-специфической енолазы (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993); Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001), промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), и нейрон-специфический промотор гена *vgf* (Piccioli et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)), среди других, которые будут очевидны квалифицированному специалисту.

В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов связывания для одной или более миРНК включены в трансген вектора на основе rAAV, чтобы ингибировать экспрессию трансгена в одной или более тканях субъекта, несущего трансген. Квалифицированный специалист поймет, что сайты связывания могут быть выбраны для контроля экспрессии трансгена тканеспецифическим образом. Например, сайты связывания для печеночно-специфической miR-122 могут быть включены в трансген для подавления экспрессии этого трансгена в печени. Целевые сайты в мРНК могут находиться в 5'-НТО, 3'-НТО или в кодирующей области. Как правило, целевой сайт находится в 3'-НТО мРНК. Кроме того, трансген может быть сконструирован таким образом, чтобы несколько миРНК регулировали мРНК, узнавая один и тот же или несколько сайтов. Наличие нескольких сайтов связывания миРНК может приводить к совместному действию нескольких RISC и обеспечивать высокоэффективное ингибирование экспрессии. Последовательность целевого сайта может содержать всего 5-100, 10-60 или более нуклеотидов. Последовательность целевого сайта может содержать по меньшей мере 5 нуклеотидов последовательности сайта связывания целевого гена.

Полипептиды слухового анализатора и кодирующие последовательности трансгенов полипептидов слухового анализатора

Состав последовательности трансгена полипептида слухового анализатора вектора на основе rAAV будет зависеть от использования, для которого будет создан результирующий вектор. Таким образом, изобретение охватывает доставку векторов на основе rAAV, кодирующих один или более полипептидов, пептидов или белков слухового анализатора, которые полезны для лечения или предотвращения болезненных состояний, связанных с потерей слуха у млекопитающего. Иллюстративные терапевтические белки включают один или более полипептидов, выбранных из группы, состоящей из отоферлина, Ca_v1.3, каркасного белка, выбранного из Bassoon, Piccolo, Ribeye и гармонина, Vglut3, синаптоагмина, белка заякоривания/стыковки везикул, белка примирования везикул, белка слияния везикул, GluA2/3 или GluA4.

В композиции AAV необязательно включены репортерные белки-полипептиды. Репортерные последовательности, которые могут быть предоставлены в трансгене, включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие β-лактамазу, β-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие белки, хорошо известные в данной области техники. Когда репортерные последовательности связаны с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, они обеспечивают сигналы, обнаруживаемые обычными средствами, включая ферментный, радиографический, колориметрический, флуоресцентный или другие спектрографические анализы, анализы сортировки флуоресцентных активируемых клеток и иммунологические анализы, включая иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) и иммуногистохимию. Например, если маркерная последовательность представляет собой ген LacZ, присутствие вектора, несущего сигнал, детектируют с помощью анализов активности β-галактозидазы. Если трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок или люциферазу, вектор, несущий сигнал, можно измерить визуально по цвету или световому излучению в люминометре. Такие репортеры могут, например, быть полезными для проверки способности к тканеспецифическому нацеливанию и тканеспецифической регуляторной активности промотора rAAV.

В другом примере трансген кодирует белок или функциональную РНК, которую предполагается использовать для создания животной модели заболевания. Соответствующие кодирующие последовательности трансгена будут очевидны специалисту в данной области техники.

Векторы на основе rAAV могут содержать ген или часть гена, кодирующего полипептид слухового анализатора, который должен быть передан субъекту для лечения заболевания, связанного со сниженной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией гена полипептида слухового анализатора или другого гена в функциональном пути полипептида слухового анализатора.

В данном первом аспекте предложены терапевтические композиции, содержащие

множество векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем множество векторов на основе AAV способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию. Предпочтительно, множество векторов на основе AAV способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию. Множество векторов на основе AAV включает первый вектор на основе AAV и второй вектор на основе AAV, при этом первый и второй векторы на основе AAV независимо имеют упаковочную способность менее около 6 кбайт. Матричная РНК полипептида слухового анализатора кодирует полипептид слухового анализатора, выбранный из группы, состоящей из отоферлина и его ортолога или гомолога, например, как предусмотрено в данном документе. Векторы на основе AAV содержат по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из промотора CBA, CMV или CB7, или одного или более специфических для улитки промоторов. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV может содержать последовательность энхансера и промотора CMV, например, SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV может содержать энхансер CMV и промотор куриного β -актина, например, SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе AAV может содержать последовательность промотора CMVd, например, SEQ ID NO: 86.

Композиции, предложенные в данном документе, содержат по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять или шесть) вектора нуклеиновых кислот, где: каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей содержит по меньшей мере 30 аминокислот (например, от около 30 до около 1950 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1600 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1550 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1500 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1450 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1400 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1350 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1300 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1250 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1200 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1150 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1100 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1050 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 1000 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 950 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 900 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 850 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 800 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 750 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 700

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

аминокислот до около 1550 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1600 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1850 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1850 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1900 аминокислот до около 1950 аминокислот), где аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой одной из кодируемых частей; ни один вектор из по меньшей мере двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлина (например, полноразмерный белок отоферлина (например, полноразмерный белок отоферлина дикого типа)); и при введении в клетку млекопитающего по меньшей мере два разных вектора подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, причем рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок отоферлина (например, полноразмерный белок отоферлина). В некоторых вариантах осуществления один из векторов нуклеиновых кислот может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует часть белка отоферлина, где кодируемая часть составляет, например, от около 900 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 900 аминокислот до около 1650

[illegible]

[illegible]

[illegible]

аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1600 аминокислот, от около 1500 аминокислот до около 1550 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 1550 аминокислот до около 1600 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1600 аминокислот до около 1650 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1650 аминокислот до около 1700 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1700 аминокислот до около 1750 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1750 аминокислот до около 1800 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1900 аминокислот, от около 1800 аминокислот до около 1850 аминокислот, от около 1850 аминокислот до около 1950 аминокислот, от около 1850 аминокислот до около 1900 аминокислот, или от около 1900 аминокислот до около 1950 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления этих композиций по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не имеет последовательности интрона, которая естественным образом встречается между двумя соседними экзонами.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность ни одной из кодируемых частей не перекрывается даже частично с аминокислотной последовательностью другой одной из кодируемых частей. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной или более кодируемых частей частично перекрывается с аминокислотной последовательностью другой одной из

кодируемых частей. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной или более кодируемых частей частично перекрывается с аминокислотной последовательностью другой одной из кодируемых частей.

В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от около 30 аминокислотных остатков до около 1000 аминокислот (например, или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе).

В некоторых примерах векторы содержат два разных вектора, каждый из которых содержит не только экзон(ы), но также и отличающийся сегмент интрона, причем интрон содержит нуклеотидную последовательность интрона, присутствующего в геномной ДНК отоферлина (например, любого из иллюстративных интронов в SEQ ID NO: 12, описанной в данном документе), и при этом два разных сегмента перекрываются в последовательности в по меньшей мере 100 нуклеотидов (например, от около 100 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 600 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 400 нуклеотидов, от около 100 нуклеотидов до около 200 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 600 нуклеотидов, от около 200 нуклеотидов до около 400 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов, от около 400 нуклеотидов до около 600 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 600 нуклеотидов).

нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 600 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 800 нуклеотидов до около 1000 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 1000 нуклеотидов до около 1500 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 2500 нуклеотидов, от около 1500 нуклеотидов до около 2000 нуклеотидов, от около 2000 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 2000 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 2000 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 2000 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 2000 нуклеотидов до около 3000 нуклеотидов, от около 2500 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 2500 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 2500 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 2500 нуклеотидов до около 3500 нуклеотидов, от около 3000 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 3000 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 3000 нуклеотидов до около 4000 нуклеотидов, от около 3500 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 3500 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 4000 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов, от около 4000 нуклеотидов до около 4500 нуклеотидов, от около 4500 нуклеотидов до около 5000 нуклеотидов), в длину.

Перекрывающаяся нуклеотидная последовательность в любых двух из разных векторов может содержать часть или все из одного или более экзонов гена отоферлина (например, любого одного или более иллюстративных экзонов в SEQ ID NO: 12, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления количество различных векторов в композиции равно двум, трем, четырем или пяти. В композициях, в которых количество

различных векторов в композиции равно двум, первый из двух разных векторов может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина. В некоторых примерах длина N-концевой части гена отоферлина составляет от около 30 аминокислот до около 1950 аминокислот (или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанного выше). В некоторых примерах первый вектор дополнительно содержит промотор (например, любой из промоторов, описанных в данном документе или известных в данной области техники) и/или последовательность Козак (например, любую из иллюстративных последовательностей Козак, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых примерах первый вектор содержит промотор, который является индуцибельным промотором, конститутивным промотором или тканеспецифическим промотором. В некоторых примерах второй из двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина. В некоторых примерах длина С-концевой части белка отоферлина составляет от 30 аминокислот до около 1950 аминокислот (или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанного выше). В некоторых примерах второй вектор дополнительно включает поли(А) сигнальную последовательность.

В некоторых примерах, где количество различных векторов в композиции равно двум, N-концевую часть, кодируемую одним из двух векторов, может содержать часть, содержащую с аминокислотного положения 1 по аминокислотное положение 1950, около аминокислотное положение 1940, около аминокислотное положение 1930, около аминокислотное положение 1920, около аминокислотное положение 1910, около аминокислотное положение 1900, около аминокислотное положение 1900, около аминокислотное положение 1890, около аминокислотное положение 1880, около аминокислотное положение 1870, около аминокислотное положение 1860, около аминокислотное положение 1850, около аминокислотное положение 1840, около аминокислотное положение 1830, около аминокислотное положение 1820, около аминокислотное положение 1810, около аминокислотное положение 1800, около аминокислотное положение 1790, около аминокислотное положение 1780, около аминокислотное положение 1770, около аминокислотное положение 1760, около аминокислотное положение 1750, около аминокислотное положение 1740, около аминокислотное положение 1730, около аминокислотное положение 1720, около аминокислотное положение 1710, около аминокислотное положение 1700, около аминокислотное положение, около аминокислотное положение 1690, около аминокислотное положение 1680, около аминокислотное положение 1670, около аминокислотное положение 1660, около аминокислотное положение 1650, около аминокислотное положение 1640, около аминокислотное положение 1630, около аминокислотное положение 1620, около аминокислотное положение 1610, около аминокислотное положение 1600, около аминокислотное положение 1590, около аминокислотное положение 1580, около аминокислотное положение 1570, около аминокислотное положение 1560, около аминокислотное положение 1550, около

[illegible]

[illegible]

аминокислотное положение 50, или около аминокислотное положение 40 белка отоферлина дикого типа (например, SEQ ID NO: 5).

В некоторых примерах, где количество различных векторов в композиции равно двум, N-концевая часть белка-предшественника отоферлина может содержать часть, содержащую с аминокислотного положения 1 по аминокислотное положение 310, с

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

В некоторых примерах композиция содержит два вектора, где первый из двух векторов содержит кодирующую последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%,

по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 62, и второй из двух векторов содержит кодирующую последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентична SEQ ID NO: 63.

В контексте данного документа термин «вектор» содержит любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т. д., который способен к репликации, когда он связан с соответствующими контрольными элементами и которые могут переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает носители для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления подходящими векторами считаются те векторы, в которых транскрибируемый сегмент нуклеиновой кислоты расположен под транскрипционным контролем промотора.

В некоторых примерах вектор может представлять собой искусственную хромосому (например, искусственную хромосому человека (НАС), искусственную хромосому дрожжей (YAC), искусственную бактериальную хромосому (BAC) или искусственную хромосому на основе P1 (PAC)) или вирусный вектор (например, любые аденовирусные векторы (например, векторы pSV или pCMV), любые ретровирусные векторы, как описано в данном документе, и любые векторы Gateway®). Вектор может, например, содержать достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой млекопитающего-хозяина или в системе экспрессии *in vitro*.

«Промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенным синтетическим аппаратом, необходимой для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности (например, гена). Фразы «функционально расположенный», «под контролем» или «под контролем транскрипции» означают, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте, чтобы контролировать инициацию РНК-полимеразы и экспрессию гена. Термин «вектор или конструктор экспрессии» означает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, в которой часть или вся кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты способна транскрибироваться. В некоторых вариантах осуществления экспрессия включает транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, для создания биологически активного полипептидного продукта или ингибирующей РНК (например, кшРНК, миРНК, ингибитора miRNA) из транскрибируемого гена.

Векторы включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы),

которые содержат рекомбинантный полинуклеотид. Специалисты смогут выбрать подходящие векторы и клетки млекопитающих для получения любой из описанных в данном документе нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду (т.е. молекулу кольцевой ДНК, которая может автономно реплицироваться внутри клетки). В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой космиду (например, серии pWE и sCos (Wahl et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2160-2164, Evans et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5030-5034).

Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор для переноса» включает способную к автономной репликации плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой искусственную хромосому. Искусственная хромосома представляет собой хромосому, созданную с помощью генной инженерии, которую можно использовать в качестве вектора для переноса больших ДНК-вставок. В некоторых вариантах осуществления искусственная хромосома представляет собой искусственную хромосому человека (HAC) (см., например, Kouprina et al., *Expert Opin. Drug Deliv* 11(4): 517-535, 2014; Basu et al., *Pediatr. Clin. North Am.* 53: 843-853, 2006; Ren et al., *Stem. Cell Rev.* 2(1):43-50, 2006; Kazuki et al., *Mol. Ther.* 19(9):1591-1601, 2011; Kazuki et al., *Gen. Ther.* 18: 384-393, 2011; и Katoh et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:280-290, 2004).

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой искусственную хромосому дрожжей (YAC) (см., например, Murray et al., *Nature* 305: 189-193, 1983; Ikeno et al. (1998) *Nat. Biotech.* 16:431-439, 1998). В некоторых вариантах

осуществления вектор(-ы) представляет собой бактериальную искусственную хромосому (BAC) (например, pBeloBAC11, pECBAC1 и pBAC108L). В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой искусственную хромосому на основе P1 (PAC). Примеры искусственных хромосом известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой вирусный вектор (например, аденоассоциированный вирус, аденовирус, лентивирус и ретровирус). В данном документе описаны неограничивающие примеры вирусных векторов.

Векторы на основе рекомбинантного AAV

«Векторы на основе рекомбинантного AAV» или «гAAV» согласно данному изобретению, как правило, состоят, как минимум, из трансгена или его части и регуляторной последовательности и, необязательно, 5'- и 3'- инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Именно этот вектор на основе рекомбинантного AAV упаковывается в капсидный белок и доставляется в выбранную целевую клетку. В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную векторным последовательностям, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, миРНК, ингибитор миРНК) или другой представляющий интерес продукт гена. Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, что обеспечивает транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке целевой ткани.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, Asokan et al., *Mol. Ther.* 20: 699-7080, 2012). «Векторы на основе рекомбинантного AAV» или «гAAV», как правило, состоят, как минимум, из трансгена или его части и регуляторной последовательности и, необязательно, 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Такой вектор на основе рекомбинантного AAV упаковывают в капсид и доставляют в выбранную целевую клетку (например, внутреннюю волосковую клетку).

Последовательности AAV вектора, как правило, содержат последовательности цис-действующих 5' и 3' инвертированных концевых повторов (см., например, BJ Carter, в "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Последовательности ITR имеют длину около 145 нуклеотидов. Предпочтительно, в молекуле используются по существу полные последовательности, кодирующие ITR, хотя допустима некоторая незначительная модификация этих последовательностей. Возможность модифицировать эти последовательности ITR находится в компетенции специалиста в данной области техники. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al. «Molecular Cloning. A Laboratory Manual», 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., *J Virol.*, 70:520 532 (1996)). Пример такой молекулы, используемой в данном изобретении, представляет собой «цис-действующую» плазмиду, содержащую трансген, в котором выбранная трансгенная последовательность и связанные с ней регуляторные элементы фланкированы 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV.

Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в настоящее время типы AAV млекопитающих.

Неограничивающим примером 5'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 59. Неограничивающим примером 3'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 60.

В дополнение к основным элементам, указанным выше для вектора на основе рекомбинантного AAV, вектор также включает необходимые традиционные контрольные элементы, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, что обеспечивает его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученными в данном изобретении. Как используется в данном документе, «функционально связанные» последовательности включают как регулирующие экспрессию последовательности, которые являются смежными с представляющим интерес геном, так и регулирующими экспрессию последовательностями, которые действуют в транс-положении или дистанционно для контроля представляющего интерес гена.

Векторы на основе AAV, как описано в данном документе, могут содержать любой из описанных в данном документе регуляторных элементов (например, один или более из промотора, поли(A)-последовательности и IRES).

Векторы на основе рекомбинантного аденовируса и лентивируса

Также предложены терапевтические композиции, содержащие один или более векторов на основе аденовируса (AV), где один или более векторов на основе AV способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке человека, которому вводят терапевтическую композицию. Предпочтительно, один из множества векторов на основе AV способен образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке субъекта-человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой аденовирус (см., например, Dmitriev et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9706-9713; и Poulin et al., *J. Virol* 8: 10074-10086, 2010). В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой ретровирус (см., например, Maier et al. (2010) *Future Microbiol* 5: 1507-23).

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой лентивирус (см., например, Matrai et al. (2010) *Mol Ther.* 18: 477-490; Banasik et al. (2010) *Gene Ther.* 17:150-7; и Wanisch et al. (2009) *Mol. Ther.* 17: 1316-32). Лентивирусный вектор относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). Неограничивающие лентивирусные векторы, которые могут использоваться в клинической практике, включают технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, систему LENTIMAX™ векторов от Lentigen и т.п. Другие типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора для доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов.

Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, например, технология доставки генов LENTIVECTOR® от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от компании Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

Например, предложены терапевтические композиции, содержащие один или более лентивирусных векторов, где один или более лентивирусных векторов способны образовывать матричную РНК полипептида слухового анализатора в целевой клетке человека, которому вводят терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления один или более лентивирусных векторов способны образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций первый вектор содержит ITR (например, любую из иллюстративных последовательностей ITR, описанных в данном документе), промотор и/или энхансер (например, любой из иллюстративных энхансеров и любой из иллюстративных промоторов, описанных в данном документе), последовательность интрона гена ОТОФ (например, гена ОТОФ человека, например, любую из иллюстративных последовательностей интрона гена ОТОФ человека, описанных в данном документе), последовательность Козак (например, любую из иллюстративных последовательностей Козак, описанных в данном документе), и последовательность, кодирующая первую, N-концевую часть белка отоферлина человека (например, любую из иллюстративных последовательностей, кодирующих первую, N-концевую часть белка отоферлина человека, описанную в данном документе), последовательность АК (например, любую иллюстративных последовательностей АК, описанных в данном документе), и ITR (например, любую из иллюстративных последовательностей ITR, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций второй вектор содержит последовательность ITR (например, любую из иллюстративных последовательностей ITR, описанных в данном документе), последовательность АК (например, любую из иллюстративных последовательностей АК, описанных в данном документе), последовательность акцептора сплайсинга (например,

любую из описанных в данном документе последовательностей акцептора сплайсинга), последовательность, кодирующую вторую часть белка отоферлина человека (например, любую из иллюстративных последовательностей, кодирующих вторую, С-концевую часть белка отоферлина человека, описанную в данном документе), поли(А) сигнальную последовательность (например, любую из иллюстративных поли(А) сигнальных последовательностей, описанных в данном документе), спейсерную последовательность (например, любую из иллюстративных спейсерных последовательностей, описанных в данном документе) и последовательность ITR (например, любую из иллюстративных последовательностей ITR, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой рAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB (SEQ ID NO: 39), изображенный на Фиг. 11, 17 и 56, или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 39. Вектор рAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB имеет длину 7625 п.н. и имеет последовательность АК в положениях нуклеотидов 2-78, акцепторный сайт сплайсинга (SA) в положениях нуклеотидов 79-129, 3' mOTOF в положениях нуклеотидов 130-3540, C2D в положениях нуклеотидов 490-891, C2E в положениях нуклеотидов 1996-2516, C2F в положениях нуклеотидов 2749-3234, WPRE в положениях нуклеотидов 3595-4188, ген устойчивости к ампициллину (AMP) в положениях нуклеотидов 5537- 6537, поли(А)-хвост гормона роста крупного рогатого скота (bGH pA) в положениях нуклеотидов 4212-4422, полученную из фага точку начала репликации (ORI) fl(+) в положениях нуклеотидов 4674-5133, точку начала репликации (ORI) в положениях нуклеотидов 6787-7012.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой рAAV-SA-3'mOTOF-EWB (SEQ ID NO: 40), изображенный на Фиг. 12, 20 и 54, или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 40. Вектор рAAV-SA-3'mOTOF-EWB имеет длину 7548 п.н. и имеет акцепторный сайт сплайсинга (SA) в положениях нуклеотидов 2-52, 3' mOTOF в положениях нуклеотидов 53-3463, C2D в положениях нуклеотидов 413-814, C2E в положениях нуклеотидов 1919-2439, C2F в положениях нуклеотидов 2672-3157, WPRE в положениях нуклеотидов 3518-4111, ген устойчивости к ампициллину (AMP) в положениях нуклеотидов 5460- 6460, поли(А)-хвост гормона роста крупного рогатого скота (bGH pA) в положениях нуклеотидов 4135-4345, и полученную из фага точку начала репликации (ORI) fl(+) в положениях нуклеотидов 4597-5056.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе

композиций вектор представляет собой рAAV-НБА-еGFP-P2A-5' mOTOF-SD (SEQ ID NO: 41), изображенный на Фиг. 13, 18 и 53, или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 41. Вектор рAAV-НБА-еGFP-P2A-5' mOTOF-SD имеет длину 7346 п.н. и имеет последовательность Козак(*) в положениях нуклеотидов 662-667, последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в положениях нуклеотидов 668-1384, P2A в положениях нуклеотидов 1391-1456, последовательность Козак в положениях нуклеотидов 1463-1468, последовательность 5' mOTOF в положениях нуклеотидов 1469-3988, C2A в положениях нуклеотидов 1469-1831, C2B в положениях нуклеотидов 2231-2599, C2C в положениях нуклеотидов 2720-3091, экзон 21 OTOF человека в положениях нуклеотидов 3872-3988, донорный сайт сплайсинга (SD) в положениях нуклеотидов 3989-4070, ген устойчивости к ампициллину в положениях нуклеотидах 5186-6186, точку начала репликации f1(+) в положениях нуклеотидах 4323-4782, точку начала репликации в положениях нуклеотидах 6436-6661, и энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидах 7277-272.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой рAAV-НБА-еGFP-P2A-5' mOTOF-SD-AK (SEQ ID NO: 42), изображенный на Фиг. 14, 19 и 55, или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 42. Вектор рAAV-НБА-еGFP-P2A-5' mOTOF-SD-AK имеет длину 7423 п.н. и имеет последовательность Козак(*) в положениях нуклеотидов 662-667, последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в положениях нуклеотидов 668-1384, P2A в положениях нуклеотидов 1391-1456, последовательность Козак в положениях нуклеотидов 1463-1468, последовательность 5' mOTOF в положениях нуклеотидов 1469-3988, C2A в положениях нуклеотидов 1469-1831, C2B в положениях нуклеотидов 2231-2599, C2C в положениях нуклеотидов 2720-3091, экзон 21 OTOF человека в положениях нуклеотидов 3872-3988, донорный сайт сплайсинга (SD) в положениях нуклеотидов 3989-4070, последовательность АК в положениях нуклеотидов 4071-4147, ген устойчивости к ампициллину в положениях нуклеотидах 5263-6263, точку начала репликации f1(+) в положениях нуклеотидах 4400-4859, точку начала репликации в положениях нуклеотидах 6513-6738, и энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидах 7354-272.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой рAKOS102 (SEQ ID NO: 43) или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере

мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 43. pAKOS102 показан на Фиг. 21. Вектор pAKOS102 имеет длину 7006 п.н. и имеет последовательность ITR AAV в положениях нуклеотидов 1-130, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 145-1144, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 1145-1486, промотор АСТВ человека в положениях нуклеотидов 1487-1869, последовательность Козак в положениях нуклеотидов 1883-1888, последовательность изоформы 5 5' hOTOF в положениях нуклеотидов 1889-4411, последовательность SD интрона в положениях нуклеотидов 4412-4493, последовательность ITR AAV2 в положениях нуклеотидов 4519-4659, ORI fl(+) в положениях нуклеотидов 4734-5189, ген устойчивости к KAN в положениях нуклеотидов 5469-6278 и ORI в положениях нуклеотидов 6357-6945.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAKOS104 (SEQ ID NO: 45) или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 45. pAKOS104 показан на Фиг. 24. Вектор pAKOS104 имеет длину 7083 п.н. и имеет последовательность ITR AAV в положениях нуклеотидов 1-130, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 145-1144, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 1145-1486, промотор АСТВ человека в положениях нуклеотидов 1487-1869, последовательность Козак в положениях нуклеотидов 1883-1888, последовательность изоформы 5 5' hOTOF в положениях нуклеотидов 1889-4411, последовательность SD интрона в положениях нуклеотидов 4412-4493, последовательность АК в положениях нуклеотидов 4494-4570, последовательность ITR AAV2 в положениях нуклеотидов 4596-4736, ORI fl(+) в положениях нуклеотидов 4811-5266, ген устойчивости к KAN в положениях нуклеотидов 5546-6355 и ORI в положениях нуклеотидов 6434-7022.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAKOS105_GFP (SEQ ID NO: 48), изображенный на Фиг. 29, или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 48. Вектор pAKOS105_GFP имеет длину 7761 п.н. и имеет последовательность ITR AAV в положениях нуклеотидов 1-130, последовательность АК в положениях нуклеотидов 145-221, последовательность сайта SA в положениях нуклеотидов 222-272, последовательность изоформы 5 3' hOTOF в положениях нуклеотидов, положения нуклеотидов 273-3740, последовательность T2A в положениях нуклеотидов 3750-3803, последовательность turboGFP в положениях нуклеотидов 3804-4499, поли(А) сигнал bGH в

положениях нуклеотидов 4509-4748, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 4749- 5248, последовательность ITR AAV2 в положениях нуклеотидов 5274-5414, ORI fl(+), в положениях нуклеотидов 5489-5944, ген устойчивости к KAN в положениях нуклеотидов 6224-7033 и ORI в положениях нуклеотидов 7112-7700.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAKOS109 (SEQ ID NO: 52) или представляет собой вектор, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 52. pAKOS109 показан на Фиг. 36, вектор pAKOS109 имеет длину 7056 п.н. и имеет последовательность ITR AAV в положениях нуклеотидов 1-130, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 145-524, промотор β -актина курицы в положениях нуклеотидов 527-802, химерный интрон в положениях нуклеотидов 803-1815, последовательность Козак в положениях нуклеотидов 1856-1861, последовательность изоформы 5' 5' hOTOF в положениях нуклеотидов 1862-4384, последовательность SD интрона в положениях нуклеотидов 4385-4466, последовательность АК в положениях нуклеотидов 4467-4543, последовательность ITR AAV2 в положениях нуклеотидов 4569-4709, ORI fl(+), в положениях нуклеотидов 4784-5239, ген устойчивости к KAN в положениях нуклеотидов 5519-6328 и ORI в положениях нуклеотидов 6407-6995.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой p109 (SEQ ID NO: 84) или представляет собой вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 84. Вектор p109 имеет длину 4711 п.н. и показан на Фиг. 38.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой p105 (SEQ ID NO: 85) или представляет собой вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 85. Вектор p105 имеет длину 4664 п.н. и показан на Фиг. 28 и 39.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 105.WPRE, приведенный на Фиг. 40. Последовательность WPRE, присутствующая в векторе 105.WPRE, представляет собой SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой p108, приведенный на Фиг. 41. Вектор p108

содержит спейсерную последовательность FVIII SEQ ID NO: 58 и последовательность энхансера и промотора CMV SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 1OTOF18.CL1, приведенный на Фиг. 42. Вектор 1OTOF18.CL1 содержит последовательность деградации CL1 SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 19OTOF48, приведенный на Фиг. 43.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 1OTOF20.CL1, приведенный на Фиг. 44. Последовательность донора сплайсинга интрона 21 в 1OTOF20, CL1 представляет собой SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 21OTOF48.WPRE, приведенный на Фиг. 45. Последовательность акцептора сплайсинга интрона 21 представляет собой SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 1OTOF21.CL1, приведенный на Фиг. 46. Последовательность донора сплайсинга интрона 22 представляет собой SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 22OTOF48.WPRE, приведенный на Фиг. 47. Последовательность акцептора сплайсинга интрона 22 представляет собой SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой 105.pA.NTF3.CMVd, приведенный на Фиг. 48. Вектор 105.pA.NTF3.CMVd содержит следующие последовательности: поли(A) SV40 (SEQ ID NO: 76), поли(A) HSV-TK (SEQ ID NO: 77), последовательность, кодирующую NTF3 человека (SEQ ID NO: 79), и CMVd (SEQ ID NO: 86).

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать энхансер CMV и промотор α -актина курицы, например, последовательность SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD (SEQ ID NO: 87) или представляет собой вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 87. Вектор pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD имеет длину 4472 п.н. и показан на Фиг. 53. Вектор pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD содержит ITR AAV (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть 5'mOTOF (SEQ ID NO: 94), и последовательность донора сплайсинга (SEQ ID NO: 64).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE (SEQ ID NO: 88) или представляет собой вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей

мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 88. Вектор pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE имеет длину 4674 п.н. и показан на Фиг. 54. Вектор pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE содержит ITR AAV (SEQ ID NO: 59), последовательность акцептора сплайсинга (SEQ ID NO: 65), последовательность, кодирующую часть 3'mOTOF (SEQ ID NO: 95), последовательность WPRE (SEQ ID NO: 69), последовательность BGHrA (SEQ ID NO: 68) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD-AK, приведенный на Фиг. 55, и имеет длину 4549 п.н. Вектор pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD-AK содержит ITR AAV (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть 5'mOTOF (SEQ ID NO: 94), последовательность SD интрона (SEQ ID NO: 72), последовательность АК (SEQ ID NO: 67) и ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-AK-SA-3'mOTOF-WPRE, приведенный на Фиг. 56, и имеет длину 4751 п.н. Вектор pAAV-AK-SA-3'mOTOF-WPRE содержит ITR AAV (SEQ ID NO: 59), последовательность АК (SEQ ID NO: 66), последовательность, кодирующую часть 3'mOTOF (SEQ ID NO: 95), последовательность WPRE (SEQ ID NO: 69), последовательность BGHrA (SEQ ID NO: 68) и ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK (плазмида p108), приведенный на Фиг. 57, и имеет длину 4567 п.н. Вектор pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK содержит AAV ITR (SEQ ID NO: 59), спейсер FVII (SEQ ID NO: 90), спейсер FVII (SEQ ID NO: 91), энхансер CMV, и промотор (SEQ ID NO: 70), часть последовательности, кодирующей 5'hOTOF (SEQ ID NO: 62), последовательность SD интрона (SEQ ID NO: 72), последовательность АК (SEQ ID NO: 67), и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP, приведенный на Фиг. 58, и имеет длину 4540 п.н. pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP содержит

последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть 5' hOTOF (SEQ ID NO: 62), рекомбиногенную последовательность AP (SEQ ID NO: 89) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-5' hOTOF-SD-AK, приведенный на Фиг. 59, и имеет длину 4745 п.н. pAAV-HBA-5' hOTOF-SD-AK содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), спейсерную последовательность FVIII (4677-5173) (SEQ ID NO: 90), спейсерную последовательность FVIII (3679-4177) (SEQ ID: 91), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть 5' hOTOF (SEQ ID NO: 62), и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 90, или последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-5' hOTOFcodop-SD-AK, приведенный на Фиг. 60, и имеет длину 4745 п.н. Вектор pAAV-CMV-5' hOTOF-SD-AK содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), спейсерную последовательность FVIII (4677-5173) (SEQ ID NO: 90), спейсерную последовательность FVIII (3679-4177) (SEQ ID: 91), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOFcodop (SEQ ID NO: 92), последовательность AK (SEQ ID NO: 67), и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-HBA-5' hOTOFcodop-SD, приведенный на Фиг. 61, и имеет длину 4668 п.н. Вектор pAAV-HBA-5' hOTOFcodop-SD содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), спейсерную последовательность FVIII (4677-5173) (SEQ ID NO: 90), спейсерную последовательность FVIII (3679-4177) (SEQ ID:

91), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codon (SEQ ID NO: 92), и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-CMV-5'hOTOF-SD, приведенный на Фиг. 62, и имеет длину 4490 п.н. Вектор pAAV-CMV-5'hOTOF-SD содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), две спейсерные последовательности FVIII, энхансер и промотор CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codon (SEQ ID NO: 92), последовательность SD интрона (SEQ ID NO: 64) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK, приведенный на Фиг. 63, и имеет длину 4567 п.н. Вектор pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), две спейсерные последовательности FVIII, энхансер и промотор CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codon (SEQ ID NO: 92), последовательность донора сплайсинга (SD) интрона (SEQ ID NO: 64), последовательность AK (SEQ ID NO: 67) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-CBA-5'hOTOF-SD-AK, приведенный на Фиг. 64, и имеет длину 4711 п.н. Вектор pAAV-CBA-5'hOTOF-SD-AK содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV и промотор бета-актина курицы (SEQ ID NO: 61), химерную интронную последовательность, последовательность, кодирующую часть последовательности 5'hOTOF codon (SEQ ID NO: 92), интронную последовательность, последовательность AK (SEQ ID NO: 67) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-CBA-5'hOTOF-SD, приведенный на Фиг. 65, и имеет длину 4634 п.н. Вектор pAAV-CBA-5'hOTOF-SD содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV и промотор бета-актина (SEQ ID NO: 61), химерную интронную последовательность, последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codon (SEQ ID NO: 92), интронную последовательность и

последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-SA-3'OTOF, приведенный на Фиг. 66, и имеет длину 4587 п.н. Вектор pAAV-CBA-5'hOTOF-SD содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), последовательность акцептора сплайсинга (SEQ ID NO: 65), последовательность, кодирующую часть последовательности 3'OTOF (SEQ ID NO: 63), последовательность bGHpA (SEQ ID NO: 68), последовательность спейсера 9 FVIII (SEQ ID NO: 57) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-AP-SA-3'OTOF, приведенный на Фиг. 67, и имеет длину 4959 п.н. Вектор pAAV-AP-SA-3'OTOF содержит последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 59), рекомбиногенную последовательность AP (SEQ ID NO: 89), последовательность акцептора сплайсинга (SEQ ID NO: 65), последовательность, кодирующую часть последовательности 3'OTOF (SEQ ID NO: 63), последовательность bGHpolyA (SEQ ID NO: 68) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе композиций вектор представляет собой pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop, приведенный на Фиг. 68, и имеет длину 4664 п.н. Вектор pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop содержит ITR AAV (SEQ ID NO: 59), последовательность AK (SEQ ID NO: 66), последовательность, кодирующую часть последовательности 3'OTOF codop (SEQ ID NO: 93), последовательность поли(A) bGH (SEQ ID NO: 68) и последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 60).

Представленные в данном документе векторы могут быть разных размеров. Выбор вектора, который используется в любой из описанных в данном документе композиций, наборов и способов, может зависеть от размера вектора.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой плазмиду и может иметь общую длину до около 1 т.п.н., до около 2 т.п.н., до около 3 т.п.н., до около 4 т.п.н., до около 5 т.п.н., до около 6 т.п.н., до около 7 т.п.н., до около 8 т.п.н., до около 9 т.п.н., до около 10 т.п.н., до около 11 т.п.н., до около 12 т.п.н., до около 13 т.п.н., до около 14 т.п.н. или до около 15 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой плазмиду и может иметь общую длину в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 11 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 12 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 13 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 14 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 15 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 11 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 12 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 13 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 14 т.п.н., от около 2 т.п.н. до

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой космиду и может иметь общую длину до 55 т.п.н. В некоторых примерах вектор представляет собой космиду и имеет общее количество нуклеотидов от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 20 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 20 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 15 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 15 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 15 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 15 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 15 т.п.н. до около 20 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 25 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 25 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 25 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 25 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 35 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 40 т.п.н. до около 55 т.п.н., от около 40 т.п.н. до около 50 т.п.н., или от около 45 т.п.н. до около 55 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой искусственную хромосому и может иметь общее количество нуклеотидов от около 100 т.п.н. до около 2000 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления искусственная хромосома(-ы) представляет собой искусственную хромосому человека (НАС) и может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от 1 т.п.н. до около 20 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 60 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 20 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 10 т.п.н. до около 60 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 30 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 20 т.п.н. до около 60 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 40 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 30 т.п.н. до около 60 т.п.н., от около 40 т.п.н. до около 50 т.п.н., от около 40 т.п.н. до около 60 т.п.н., или от около 50 т.п.н. до около 60 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления искусственная хромосома(-ы) представляет собой искусственную хромосому дрожжей (YAC) и может иметь общее количество нуклеотидов до 1000 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления искусственная хромосома(-ы) представляет собой YAC, имеющую общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 100 т.п.н. до около 1,000 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 900 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 800 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 700 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 600 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 500 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 400 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 300 т.п.н., от около 100 т.п.н. до около 200 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 1,000 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 900 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 800 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 700 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 600 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 500 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 400 т.п.н., от около 200 т.п.н. до около 300 т.п.н., от около 300 т.п.н. до около 1,000 т.п.н., от около 300

аденовирус(-ы) может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой аденоассоциированный вирус (вектор на основе AAV) и может иметь общее количество нуклеотидов до 5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) на основе AAV может содержать общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н. или от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(-ы) представляет собой вектор Gateway® и может иметь общее количество нуклеотидов до 5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления каждый вектор(-ы) Gateway® имеет общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., или от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н.

В некоторых вариантах осуществления любых композиций, наборов и способов, предложенных в данном документе, по меньшей мере два разных вектора могут быть по существу одним и тем же типом вектора и могут отличаться по размеру. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два разных вектора могут быть векторами разных типов и могут иметь по существу одинаковый размер или иметь разные размеры.

В некоторых вариантах осуществления любой из по меньшей мере двух векторов может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 500 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 9500 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 8000 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 7800 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 7600 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 7400 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 7200 нуклеотидов, от около 500 нуклеотидов до около 7000

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

нуклеотидов до около 7400 нуклеотидов, от около 6800 нуклеотидов до около 7200
 нуклеотидов, от около 6800 нуклеотидов до около 7000 нуклеотидов, от около 7000
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 7000
 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 8000
 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 7800 нуклеотидов, от около 7000
 нуклеотидов до около 7600 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 7400
 нуклеотидов, от около 7000 нуклеотидов до около 7200 нуклеотидов, от около 7200
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 7200 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, от около 7200 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 7200
 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 7200 нуклеотидов до около 8000
 нуклеотидов, от около 7200 нуклеотидов до около 7800 нуклеотидов, от около 7200
 нуклеотидов до около 7600 нуклеотидов, от около 7200 нуклеотидов до около 7400
 нуклеотидов, от около 7400 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 7400
 нуклеотидов до около 9500 нуклеотидов, от около 7400 нуклеотидов до около 9000
 нуклеотидов, от около 7400 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 7400
 нуклеотидов до около 8000 нуклеотидов, от около 7400 нуклеотидов до около 7800
 нуклеотидов, от около 7400 нуклеотидов до около 7600 нуклеотидов, от около 7600
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 7600 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, от около 7600 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 7600
 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 7600 нуклеотидов до около 8000
 нуклеотидов, от около 7600 нуклеотидов до около 7800 нуклеотидов, от около 7800
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 7800 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, от около 7800 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 7800
 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 7800 нуклеотидов до около 8000
 нуклеотидов, от около 8000 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 8000
 нуклеотидов до около 9500 нуклеотидов, от около 8000 нуклеотидов до около 9000
 нуклеотидов, от около 8000 нуклеотидов до около 8500 нуклеотидов, от около 8500
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 8500 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, от около 8500 нуклеотидов до около 9000 нуклеотидов, от около 9000
 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов, от около 9000 нуклеотидов до около 9500
 нуклеотидов, или от около 9500 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов (включительно).

Для введения любого из описанных в данном документе векторов в клетку млекопитающего (например, внутреннюю волосковую клетку улитки) можно использовать множество различных способов, известных в данной области техники. Неограничивающие примеры способов введения нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего включают: липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию с использованием высокоразветвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримера, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц (например, трансфекцию наночастиц) или

трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом)), микроинъекцию, электропорацию, сжатие клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалфекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

Квалифицированные практикующие специалисты поймут, что любой из описанных в данном документе векторов может быть введен в клетку млекопитающего, например, при помощи липофекции.

В данной области техники также известны различные методы молекулярной биологии, которые можно использовать для введения мутации(-й) и/или делеции(-й) в эндогенный ген. Неограничивающие примеры таких методов включают сайт-направленный мутагенез, CRISPR (например, индуцированные CRISPR/Cas9 нокин-мутации и индуцированные CRISPR/Cas9 нокаут-мутации) и TALEN. Эти методы можно использовать для коррекции последовательности дефектного эндогенного гена, присутствующего в хромосоме целевой клетки.

Любой из описанных в данном документе векторов может дополнительно содержать контрольную последовательность, например, контрольную последовательность, выбранную из группы последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли(А)) и консенсусной последовательности Козак. В данном документе описаны неограничивающие примеры этих контрольных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифический промотор.

Промоторы

В данном документе описаны неограничивающие примеры промоторов. Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий N-концевую часть белка отоферлина (например, белка отоферлина человека), может содержать промотор и/или энхансер. Вектор, кодирующий N-концевую часть белка отоферлина, может содержать любой из промоторов и/или энхансеров, описанных в данном документе или известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, промотор клеток млекопитающих, вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифический промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, такой как промотор РНК-полимеразы II млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы III, включая, но не ограничиваясь этим, промотор H1, промотор U6 человека,

промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Промотор, как правило, может способствовать транскрипции в клетках, таких как волосковые клетки. В некоторых примерах промотор является специфическим для улитки промотором или ориентированным на улитку промотором.

В данной области техники известно множество промоторов, которые можно использовать в данном документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в данном документе, включают промоторы от: субъединицы фактора элонгации 1 α человека (EF1a) (Liu et al. (2007) *Exp. Mol. Med.* 39(2): 170-175; номер доступ J04617.1; Gill et al., *Gene Ther.* 8(20):1539-1546, 2001; Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332; Ikeda et al., *Gene Ther.* 9:932-938, 2002; Gilham et al., *J. Gene Med.* 12(2):129-136, 2010), цитомегаловируса (Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332; Gray et al., *Human Gene Ther.* 22:1143-1153, 2011), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV) (патент США № 5168062, Liu et al. (2007) *Exp. Mol. Med.* 39(2): 170-175; номер доступа X17403.1 или KY490085.1), убиквитина С человека (UBC) (Gill et al., *Gene Ther.* 8(20):1539-1546, 2001; Qin et al., *PLoS One* 5(5):e10611, 2010), фосфоглицерат киназы 1 мыши, полиомы аденовируса, вируса обезьяны 40 (SV40), β -глобина, β -актина, α -фетопроетина, γ -глобина, β -интерферона, γ -глутамилтрансферазы, вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса саркомы Рауса, инсулина крысы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, металлотронеина II (MT II), амилазы, катепсина, мускаринового рецептора M1, ретровирусного LTR (например вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV), ITR AAV, интерлейкина-2, коллагеназы, фактора роста тромбоцитов, аденовируса 5 E2, стромелизина, гена MX мыши, белков, регулируемых глюкозой (GRP78 и GRP94), α -2-макроглобулина, виментина, гена ГКГС класса I, H-2k b, HSP70, пролиферина, фактора некроза опухоли, гена α тиреотропного гормона, легкой цепи иммуноглобулина, Т-клеточного рецептора, DQ α и DQ β HLA, рецептора интерлейкина-2, ГКГС класса II, HLA-DR α ГКГС класса II, мышечной креатинкиназы, преальбумина (транстиретина), эластазы I, гена альбумина, c-fos, c-HA-gas, молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), гистона H2B (TH2B), гормона роста крысы, сывороточного амилоида человека (SAA), тропонина I (TN I), мышечной дистрофии Дюшенна, вируса иммунодефицита человека и вируса лейкоза гиббонов (GALV), промотор HNRPA2B1-CBX1 (UCOE) (Powell and Gray (2015) *Discov. Med.* 19(102): 49-57; Antoniou et al., *Human Gene Ther.* 24(4):363-374, 2013), β -глюкуронидазы (GUSB) (Husain et al., *Gene Ther.* 16:927-932, 2009), β -актина курицы (CBA) (Liu et al. (2007) *Exp. Mol. Med.* 39(2): 170-175; Stone et al. (2005) *Mol. Ther.* 11(6): 843-848; Klein et al., *Exp. Neurol.* 176(1):66-74, 2002; Ohlfest et al., *Blood* 105:2691-2698, 2005; Gray et al., *Human Gene Ther.* 22:1143-1153, 2011), промотор β -актина человека (HBA) (номер доступа Y00474.1), мышечного миозина VIIA (musMyo7) (Boeda et al. (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10(15): 1581-1589; номер доступа AF384559.1), человеческого миозина VIIA (hsMyo7) (Boeda et al. (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10(15): 1581-1589; номер доступа NG_009086.1), мышечной поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 (musPARP2) (Ame et al. (2001)

J. Biol. Chem. 276(14): 11092-11099; номер доступа AF191547.1), человеческой поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 (hsPARP2) (Ame et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(14): 11092-11099; номер доступа X16612.1 или AF479321.1), эpsilon-субъединицы ацетилхолинового рецептора (AChE) (Duclert et al. (1993) PNAS 90(7): 3043-3047; номер доступа S58221.1 или CR933736.12), вируса саркомы Рауса (RSV) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; номер доступа M77786.1), (GFAP) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; Stone et al. (2005) Mol. Ther. 11(6): 843-848; номер доступа NG_008401.1 или M67446.1), hAAT (Van Linthout et al., *Human Gene Ther.* 13(7):829-840, 2002; Cunningham et al., *Mol. Ther.* 16(6):1081-1088, 2008), и гибрида CBA (CBh) (Gray et al. (2011) Hum. Gen. Therapy 22: 1143-1153; номер доступа KF926476.1 или KC152483.1). Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники. См., например, Lodish, *Molecular Cell Biology*, Freeman and Company, New York 2007. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой немедленно-ранний промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA.

Термин «функционально связанный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок (например, белок отоферлин), вызывает транскрипцию РНК из нуклеиновой кислоты в клетке млекопитающего при большинстве или во всех физиологических условиях.

Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (см., например, Boshart et al, *Cell* 41:521-530, 1985), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфолипидкиназы (PGK) и промотор EF1-альфа (Invitrogen).

Термин «индуцибельный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует этому промотору.

Индукцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Дополнительные примеры индуцибельных промоторов известны в данной области техники.

Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор овечьего металлотионина (MT), промотор дексаметазон (Dex) -индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:3346-3351, 1996), тетрациклин-репрессируемая система (Gossen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5547-5551, 1992), тетрациклином-индуцируемая система (Gossen et al. *Science* 268:1766-1769, 1995, см. также Harvey et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512-518, 1998), RU486-индуцируемую систему (Wang et al. *Nat. Biotech.* 15:239-243, 1997) и Wang et al. *Gene Ther.* 4:432-441, 1997), и рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al. *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872, 1997).

Термин «тканеспецифический» промотор относится к промотору, который активен только в определенных типах клеток и/или тканях (например, транскрипция определенного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регуляторные белки транскрипции, которые связываются с тканеспецифическим промотором).

Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяющимся геном, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку такого типа ткани, который соответствует промотору.

Термин «регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию продукта гена, функционально связанного с регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может быть последовательностью энхансера и другими регуляторными элементами, которые регулируют экспрессию продукта гена.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные последовательности обеспечивают тканеспецифическую экспрессию генов. В некоторых случаях тканеспецифические регуляторные последовательности связывают тканеспецифические

факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом.

В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для волосковых клеток улитки промотор. Неограничивающие примеры специфический для волосковых клеток улитки промоторов включают, но не ограничиваются ими: промотор АТОН1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор α 9ACHR и промотор α 10ACHR.

Энхансеры и 5'-кэп

В некоторых случаях вектор может содержать последовательность промотора и/или последовательность энхансера. Термин «энхансер» относится к нуклеотидной последовательности, которая может повышать уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющей интерес белок (например, белок отоферлин). Последовательности энхансеров (50-1500 пар оснований в длину), как правило, повышают уровень транскрипции, обеспечивая дополнительные сайты связывания для белков, связанных с транскрипцией (например, факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера находится в последовательности интрона. В отличие от последовательностей промоторов, последовательности энхансеров могут действовать на гораздо большем расстоянии от сайта начала транскрипции (например, по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и энхансер SV40. Пример энхансера CMV описан, например, в Boshart et al., Cell 41(2):521-530, 1985.

Как используется в данном документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп РНК 7-метилгуанозин или кэп РНК m.sup.7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавили в «переднюю часть» или к 5'-концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит котранскрипционно таким образом, что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

Поли(А) последовательности

В некоторых вариантах осуществления любой из представленных в данном документе векторов может содержать поли(А) последовательность. Большинство зарождающихся эукариотических мРНК имеют поли(А)-хвост на своем 3'-конце, который

добавляется во время сложного процесса, который включает расщепление первичного транскрипта и реакцию связанного полиаденилирования (см., например, Proudfoot et al., *Cell* 108:501-512, 2002). Поли(А)-хвост придает мРНК стабильность и транспортируемость (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994). В некоторых вариантах осуществления поли(А) последовательность расположена на 3' относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей С-конец белка отоферлина.

Используемый в данном документе термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, которые содержат определенную последовательность, сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок помогают защитить мРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

Используемый в данном документе термин «поли(А) сигнальная последовательность» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

Используемый в данном документе «поли(А)» представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструкт для временной экспрессии поли(А) находится между 50 и 5000, предпочтительно более чем 64, более предпочтительно более чем 100, наиболее предпочтительно более чем 300 или 400. Поли(А) последовательности можно модифицировать химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Существует несколько поли(А) сигнальных последовательностей, которые можно использовать, в том числе полученные из бычьего гормона роста (bgh) (Woychik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81(13):3944-3948, 1984; патент США № 5122458; Yew et al., *Human Gene Ther.* 8(5):575-584, 1997; Xu et al., *Human Gene Ther.* 12(5):563-573, 2001; Xu et al., *Gene Ther.* 8:1323-1332, 2001; Wu et al., *Mol. Ther.* 16(2):280-289, 2008; Gray et al., *Human Gene*

Ther. 22:1143-1153, 2011; Choi et al., *Mol. Brain* 7:17, 2014), β -глобина мышцы, α -глобина мышцы (Orkin et al., *EMBO J.* 4(2):453-456, 1985; Thein et al., *Blood* 71(2):313-319, 1988), коллагена человека, вируса полиомы (Batt et al., *Mol. Cell Biol.* 15(9):4783-4790, 1995), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354), гормона роста человека (hGH) (Szymanski et al., *Mol. Therapy* 15(7):1340-1347, 2007; Ostegaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(8):2952-2957, 2005), синтетической поли(A) (Levitt et al., *Genes Dev.* 3(7):1019-1025, 1989; Yew et al., *Human Gene Ther.* 8(5):575-584, 1997; Ostegaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(8):2952-2957, 2005; Choi et al., *Mol. Brain* 7:17, 2014), поли(A) энхансера 3'-5'-дирекционного типа ВИЧ-1 (Schambach et al., *Mol. Ther.* 15(6):1167-1173, 2007), поли(A) энхансера 3'-5'-дирекционного типа аденовируса (L3) (Schambach et al., *Mol. Ther.* 15(6):1167-1173, 2007), поли(A) энхансера 3'-5'-дирекционного типа hTHGB (Schambach et al., *Mol. Ther.* 15(6):1167-1173, 2007), поли(A) энхансера 3'-5'-дирекционного типа hC2 (Schambach et al., *Mol. Ther.* 15(6):1167-1173, 2007), группы, состоящей из сайта поли(A) SV40, такого как позднего и раннего сайта поли(A) SV40 (Schek et al., *Mol. Cell Biol.* 12(12):5386-5393, 1992; Choi et al., *Mol. Brain* 7:17, 2014; Schambach et al., *Mol. Ther.* 15(6):1167-1173, 2007). Неограничивающим примером поли(A) сигнальной последовательности является SEQ ID NO: 68, 76 или 77.

Поли(A) сигнальная последовательность может представлять собой последовательность ААТААА. Последовательность ААТААА может быть замещена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными ААТААА, которые способны передавать сигнал полиаденилирования, включая АТТААА, АГТААА, САТААА, ТАТААА, ГАТААА, АСТААА, ААТАТА, ААГААА, ААТААТ, АААААА, ААТГАА, ААТСАА, ААСААА, ААТСАА, ААТААС, ААТАГА, ААТТАА, или ААТААГ (см., например, WO 06/12414).

В некоторых вариантах осуществления поли(A) сигнальная последовательность может представлять собой синтетический сайт полиаденилирования (см., например, вектор экспрессии pCl-neo компании Promega, который основан на Levitt et al., *Genes Dev.* 3(7):1019-1025, 1989). В некоторых вариантах осуществления поли(A) сигнальная последовательность представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (АААТААААТАСГАААТГ) (см., например, WO 05/073384). Дополнительные примеры поли(A) сигнальных последовательностей известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления любой из предложенных в данном документе векторов может содержать посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), например, SEQ ID NO: 69.

Внутренний участок посадки рибосомы (IRES)

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий С-конец белка отоферлина, может содержать полинуклеотидный внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более одного полипептида

из одного транскрипта гена. IRES образует сложную вторичную структуру, которая позволяет инициировать трансляцию из любого положения с мРНК, расположенной непосредственно ниже по ходу трансляции того места, где находится IRES (см., например, Pelletier and Sonenberg, *Mol. Cell. Biol.* 8(3):1103-1112, 1988).

Специалистам в данной области техники известно несколько последовательностей IRES, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), риновируса человека (HRV), вируса паралича сверчка, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита С (HCV) и полиовируса (PV). См., например, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002; and Hellen et al., *Genes Dev.* 15(13):1593-612, 2001.

В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES, которая включена в вектор, кодирующий С-конец белка отоферлина, представляет собой вирус ящура (FMDV). Последовательность вируса ящура 2А представляет собой небольшой пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J. Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999). Активность расщепления последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и векторы для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J. Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999; de Felipe et al., *Gene Therapy* 6:198-208, 1999; de Felipe et al., *Human Gene Therapy* 11:1921-1931, 2000; и Klump et al., *Gene Therapy* 8:811-817, 2001).

Репортерные последовательности

Любой из предложенных в данном документе векторов может необязательно содержать последовательность, кодирующую репортерный белок («репортерную последовательность»). В данном документе описаны неограничивающие примеры репортерных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления репортерную последовательность можно использовать для проверки способности к нацеливанию на тканевую специфичность и регуляторную активность тканеспецифического промотора любого из векторов, описанных в данном документе.

NTF3

Любой из предложенных в данном документе векторов может необязательно содержать последовательность, кодирующую белок нейротрофин-3 (NTF3). В некоторых вариантах осуществления белок NTF3 может иметь последовательность, которая идентична на по меньшей мере 70%, идентична на по меньшей мере 72%, идентична на по меньшей мере 74%, идентична на по меньшей мере 76%, идентична на по меньшей мере 78%, идентична на по меньшей мере 80%, идентична на по меньшей мере 82%, идентична на по меньшей мере 84%, идентична на по меньшей мере 86%, идентична на по меньшей мере 88%, идентична на по меньшей мере 90%, идентична на по меньшей мере 92%, идентична на по меньшей мере 94%, идентична на по меньшей мере 96%, идентична на по меньшей мере

мере 98%, идентична на по меньшей мере 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления белок NTF3 может содержать последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 78, за исключением того, что она содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен и/или делеций.

В некоторых вариантах осуществления белок NTF3 может кодироваться последовательностью, которая идентична на по меньшей мере 70%, идентична на по меньшей мере 72%, идентична на по меньшей мере 74%, идентична на по меньшей мере 76%, идентична на по меньшей мере 78%, идентична на по меньшей мере 80%, идентична на по меньшей мере 82%, идентична на по меньшей мере 84%, идентична на по меньшей мере 86%, идентична на по меньшей мере 88%, идентична на по меньшей мере 90%, идентична на по меньшей мере 92%, идентична на по меньшей мере 94%, идентична на по меньшей мере 96%, идентична на по меньшей мере 98%, идентична на по меньшей мере 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 79 или 80.

Специалист в данной области техники поймет, что мутация аминокислот, которые не консервативны между одним и тем же белком из разных видов, с меньшей вероятностью окажет влияние на функцию белка, и поэтому эти аминокислоты должны быть выбраны для мутации. Аминокислоты, которые консервативны между одним и тем же белком разных видов, не должны подвергаться мутации, поскольку эти мутации с большей вероятностью приведут к изменению функции белка. Неограничивающие примеры нейтрофина-3 от других видов млекопитающих приведены ниже.

Нейротрофин-3 коровы (SEQ ID NO: 81)

Нейротрофин-3 крысы (SEQ ID NO: 82)

Нейротрофин-3 свиньи (SEQ ID NO: 83)

Фланкирующие области, нетранслируемые области (UTR)

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе векторов (например, любой из по меньшей мере двух разных векторов) может содержать нетранслируемую область. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать 5'-UTR или 3'-UTR.

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5'-UTR начинается с места начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не содержит стартовый кодон. 3'-UTR начинается сразу же после стоп-кодона и продолжается до сигнала завершения транскрипции. Появляется все больше данных о регуляторных ролях, которые играют UTR с точки зрения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные свойства UTR могут быть включены в любой из векторов, композиций, наборов или способов, как описано в данном документе, для повышения стабильности белка отоферлина.

Природные 5'-UTR включают последовательность, которая играет роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры, такие как последовательности Козак, которые, как известно, участвуют в процессе, с помощью которого рибосома иницирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR

(A/G) CCAUGG, где R представляет собой пурин (А или G) на три основания выше по ходу транскрипции от стартового кодона (AUG), а за стартовым кодоном следует еще один «G». Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

Например, в некоторых вариантах осуществления 5'-UTR включен в любой из описанных в данном документе векторов. Неограничивающие примеры 5'-UTR, в том числе от следующих генов: альбумин, сывороточный амилоид А, аполипопротеин А/В/Е, трансферрин, альфа-фетопроtein, эритропоэтин и фактор VIII, могут быть использованы для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК.

В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улитке, может быть включена в любой из описанных в данном документе векторов, композиций, наборов и способов.

Известно, что 3'-UTR имеют встроенные в них участки аденозинов и уридинов. Эти богатые AU сигнатуры особенно распространены в генах с высоким уровнем оборотов. На основе их особенностей последовательности и функциональных свойств, богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., *Mol. Cell. Biol.* 15:5777-5788, 1995; Chen et al., *Mol. Cell Biol.* 15:2010-2018, 1995): ARE класса I содержат несколько рассеянных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. Например, мРНК с-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II имеют два или более перекрывающихся девятизвенных полимеров UUAUUUA(U/A) (U/A). мРНК GM-CSF и TNF-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III менее четко определены. Эти богатые U области не содержат мотив AUUUA. Два хорошо изученных примера этого класса представляют собой мРНК с-Jun и миогенина.

Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют матрицу, тогда как было зарегистрировано, что члены семейства ELAV, особенно HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование сайтов связывания, специфических для HuR в 3'-UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, стабилизации матричной *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления введение, удаление или модификацию 3'-UTR ARE можно использовать белок отоферлин. В других вариантах осуществления ARE могут быть удалены или мутированы для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, для увеличения трансляции и продуцирования белка отоферлина.

В других вариантах осуществления последовательности, не являющиеся ARE, могут быть включены в 5'- или 3'- UTR. В некоторых вариантах осуществления интроны или части последовательностей интронов могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любом из предложенных в данном документе векторов, композиций, наборов и способов. Включение интронных последовательностей может увеличивать продукцию белка, а также уровни мРНК. Интрон может быть интроном из гена отоферлина или может быть интроном из гетерологичного гена, например, интрона гибридного

аденовируса/иммуноглобулина мыши. (Yew et al., *Human Gene Ther.* 8(5):575-584, 1997), интрона SV40 (Ostedgaard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(8):2952-2957, 2005), интрона MVM (Wu et al., *Mol. Ther.* 16(2):280-289, 2008), усеченного интрона 1 фактора IX (Wu et al., *Mol. Ther.* 16(2):280-289, 2008; Kurachi et al., *J. Biol. Chem.* 270(10):5276-5281, 1995), химерного интрона донора сплайсинга α -глобулина/акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина (Wu et al., *Mol. Ther.* 16(2):280-289, 2008; Choi et al., *Mol. Brain* 7:17, 2014), интрона позднего донора сплайсинга/акцептора сплайсинга SV40 (19S/16S) (Yew et al., *Human Gene Ther.* 8(5):575-584, 1997), гибридного донора сплайсинга аденовируса/акцептора сплайсинга IgG (Choi et al., *Mol. Brain* 7:17, 1991; Huang and Gorman, *Mol. Cell Biol.* 10(4):1805-1810, 1990).

Неограничивающими примерами последовательностей доноров сплайсинга и акцепторов сплайсинга являются SEQ ID NO: 64 и 65, соответственно; SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно; и SEQ ID NO: 74 и 75, соответственно.

Дестабилизирующие домены

Любой из предложенных в данном документе векторов может необязательно содержать последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен («последовательность дестабилизирующего домена»). Дестабилизирующий домен представляет собой аминокислотную последовательность, которая снижает период полужизни *in vivo* или *in vitro* белка, который включает дестабилизирующий домен, например, по сравнению с тем же белком, у которого отсутствует стабилизирующий домен. Например, дестабилизирующий домен может привести к нацеливанию на белок, который включает дестабилизирующий домен для протеосомной деградации. Неограничивающие примеры дестабилизирующих доменов включают дестабилизирующий домен дигидрофолатредуктазы *E. coli* (DHFR) (Iwamoto et al. (2010) *Chem. Biol.* 17 (9): 981-998) и белок связывания FK-506 (FKBP) (Венлин и др. (2015) *PLoS One* 10 (12): e0145783). SEQ ID NO: 53 представляет собой иллюстративную аминокислотную последовательность дестабилизирующего домена DHFR. В данной области техники известны дополнительные примеры дестабилизирующих доменов.

В некоторых вариантах осуществления любой из предложенных в данном документе векторов может необязательно включать последовательность деградации, например, последовательность деградации CL1 SEQ ID NO: 71.

Дополнительные последовательности

Любой из предложенных в данном документе векторов может необязательно включать дополнительные нуклеотидные последовательности («спейсерную последовательность») для оптимизации общего количества пар оснований в векторе. Например, для оптимизации упаковки каждый вектор может быть разработан таким образом, чтобы он содержал в общей сложности от около 4000 пар оснований до около 4700 пар оснований, например, от около 4000 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4000 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4000 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4000 пар оснований до около 4500 пар оснований, от

[illegible]

около 4250 пар оснований до около 4450 пар оснований, от около 4250 пар оснований до около 4400 пар оснований, от около 4250 пар оснований до около 4350 пар оснований, от около 4250 пар оснований до около 4300 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4500 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4450 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4400 пар оснований, от около 4300 пар оснований до около 4350 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4500 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4450 пар оснований, от около 4350 пар оснований до около 4400 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4500 пар оснований, от около 4400 пар оснований до около 4450 пар оснований, от около 4450 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4450 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4450 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4450 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4450 пар оснований до около 4500 пар оснований, от около 4500 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4500 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4500 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4500 пар оснований до около 4550 пар оснований, от около 4550 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4550 пар оснований до около 4650 пар оснований, от около 4550 пар оснований до около 4600 пар оснований, от около 4600 пар оснований до около 4700 пар оснований, от около 4600 пар оснований до около 4650 пар оснований, или от около 4650 пар оснований до около 4700 пар оснований (включительно).

Спейсерная последовательность может быть любой нуклеотидной последовательностью, например, длиной до 1000 п.н., которая может быть включена в любой из описанных в данном документе векторов, который не транскрибируется и не выполняет регуляторную функцию для достижения желаемого размера вектора (например, размера вектора от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., или любого из размеров вектора, предложенных в данном документе). Например, спейсерная последовательность может представлять собой любую нуклеотидную последовательность от около 100 до около 1000 п.н. (например, от около 100 до около 900 п.н., от около 100 п.н. до около 800 п.н., от около 100 п.н. до около 700 п.н., от около 100 п.н. до около 600 п.н., от около 100 п.н. до около 500 п.н., от около 100 п.н. до около 400 п.н., от около 100 п.н. до около 300 п.н., от около 100 п.н. до около 100 п.н., от около 200 п.н. до около 1000 п.н., от около 200 п.н. до около 900 п.н., от около 200 п.н. до около 800 п.н., от около 200 п.н. до около 700 п.н., от около 200 п.н. до около 600 п.н., от около 200 п.н. до около 500 п.н., от около 200 п.н. до около

400 п.н., от около 200 п.н. до около 300 п.н., от около 300 п.н. до около 1000 п.н., от около 300 п.н. до около 900 п.н., от около 300 п.н. до около 800 п.н., от около 300 п.н. до около 700 п.н., от около 300 п.н. до около 600 п.н., от около 300 п.н. до около 500 п.н., от около 300 п.н. до около 400 п.н., от около 400 п.н. до около 1000 п.н., от около 400 п.н. до около 900 п.н., от около 400 п.н. до около 800 п.н., от около 400 п.н. до около 700 п.н., от около 400 п.н. до около 600 п.н., от около 400 п.н. до около 500 п.н., от около 500 п.н. до около 1000 п.н., от около 500 п.н. до около 900 п.н., от около 500 п.н. до около 800 п.н., от около 500 п.н. до около 700 п.н., от около 500 п.н. до около 600 п.н., от около 600 п.н. до около 1000 п.н., от около 600 п.н. до около 900 п.н., от около 600 п.н. до около 800 п.н., от около 600 п.н. до около 700 п.н., от около 700 п.н. до около 1000 п.н., от около 700 п.н. до около 900 п.н., от около 700 п.н. до около 800 п.н., от около 800 п.н. до около 1000 п.н., около 100 п.н., около 150 п.н., около 200 п.н., около 250 п.н., около 300 п.н., около 350 п.н., около 400 п.н., около 450 п.н., около 500 п.н., около 550 п.н., около 600 п.н., около 650 п.н., около 700 п.н., около 750 п.н., около 800 п.н., около 850 п.н., около 900 п.н., около 950 п.н., или около 1000 п.н. SEQ ID NO. 54-58, 90 и 91 представляют собой иллюстративные спейсерные последовательности человеческого фактора VIII, которые можно использовать в любом из векторов, описанных в данном документе. В данной области техники известны дополнительные спейсерные последовательности. Иллюстративные векторы, которые содержат спейсерные последовательности, показаны на Фиг. 21-31, 36,37, 59-63 и 66.

Клетки млекопитающих

В данном документе также предложена клетка (например, клетка млекопитающего), которая содержит любую из нуклеиновых кислот, векторов (например, по меньшей мере, два разных вектора, описанных в данном документе) или композиций, описанных в данном документе. Квалифицированные практики поймут, что описанные в данном документе нуклеиновые кислоты и векторы могут быть введены в любую клетку млекопитающего. В данном документе описаны неограничивающие примеры векторов и способов введения векторов в клетки млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, клетку мыши, клетку свиньи, клетку кролика, клетку собаки, клетку кошки, клетку крысы, клетку овцы, клетку лошади или клетку отличного от человека примата. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой специализированную клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки или наружную волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки.

В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего находится в *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего находится в организме млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего

представляет собой аутологичную клетку, полученную от субъекта и культивируемую *ex vivo*.

Способы

В настоящем документе также предложен способ введения в улитку млекопитающего (например, человека) терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. Также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего (например, человека), которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций. Также предложены способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта (например, человека), идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, причем способы включают введение терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций в улитку субъекта. В некоторых примерах описанные в данном документе способы могут дополнительно включать введение нейротрофического фактора в улитку субъекта (например, по существу, в то же время, когда субъекту вводят любую из описанных в данном документе композиций). В некоторых примерах описанные в данном документе способы могут дополнительно включать введение субъекту кохлеарного имплантата (например, практически одновременно с введением субъекту любой из описанных в данном документе композиций).

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов млекопитающее было ранее идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина (например, ген отоферлина, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности белка отоферлина, кодируемого геном). Некоторые варианты осуществления любого из этих способов дополнительно включают до стадии внесения или введения определение того, что у субъекта имеется дефектный ген отоферлина. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут дополнительно включать обнаружение мутации в гене отоферлина у субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из способов могут дополнительно включать идентификацию или диагностику у субъекта бессимптомной нейросенсорной потери слуха.

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов две или более доз любой из описанных в данном документе композиций вносятся или вводятся в улитку млекопитающего или субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать внесение или введение первой дозы композиции в улитку млекопитающего или субъекта, оценку функции слуха млекопитающего или субъекта после внесения или введения первой дозы и введение дополнительной дозы композиции в улитку млекопитающего или субъекта, у которого обнаружено отсутствие функции слуха в пределах нормального диапазона (например, как определено с помощью любого теста на слух, известного в данной области техники).

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе

способов композиция может быть составлена для интракохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов описанные в данном документе композиции можно применять посредством интракохлеарного введения или местного применения. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов композиции вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления интракохлеарное введение может быть выполнено с использованием любого из способов, описанных в данном документе или известных в данной области техники. Например, композицию можно вносить или вводить в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с использованием визуализации с помощью 2,5 мм жесткого эндоскопа с углом обзора 0 градусов, внешний слуховой канал очищается и круглый нож используется для четкого очертания барабанной перепонки диаметром около 5 мм. Барабанную перепонку поднимают, и осуществляют введение в среднее ухо сзади. Нервы барабанной перепонки идентифицируют и разделяют, а для удаления скутальной кости используют кюретку, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенной или внесенной композиции может быть использован хирургический лазер для создания небольшого 2-мм фенестрационного отверстия в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии композиции через мембрану круглого окна. Затем загружают микроинфузионное устройство и доставляют в операционное поле. Устройство направляют к круглому окну, и наконечник помещают внутри костного круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроиглы(-у) в мембрану. Задействуют ножную педаль для обеспечения измеримой, устойчивой инфузии композиции. Затем устройство извлекают, а круглое окно и стремечко заклеивают гель-пенной.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее представляет собой грызуна, отличного от человека примата, или человека. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее представляет собой взрослого, подростка, молодого человека, ребенка, малыша, младенца или новорожденного. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее имеет возраст 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110, или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе

способов эти способы приводят к улучшению слуха (например, любого из показателей для определения улучшения слуха, описанных в данном документе) у субъекта, нуждающегося в этом, в течение по меньшей мере 10 суток, по меньшей мере 15 суток, по меньшей мере 20 суток, по меньшей мере 25 суток, по меньшей мере 30 суток, по меньшей мере 35 суток, по меньшей мере 40 суток, по меньшей мере 45 суток, по меньшей мере 50 суток, по меньшей мере 55 суток, по меньшей мере 60 суток, по меньшей мере 65 суток, по меньшей мере 70 суток, по меньшей мере 75 суток, по меньшей мере 80 суток, по меньшей мере 85 суток, по меньшей мере 100 суток, по меньшей мере 105 суток, по меньшей мере 110 суток, по меньшей мере 115 суток, по меньшей мере 120 суток, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов у субъекта или млекопитающего имеется несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или существует риск ее развития. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее ранее были идентифицированы как имеющие мутацию в гене отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее имеют любую из мутаций в гене отоферлина, которые описаны в данном документе или известны в данной области техники как связанные с бессимптомной нейросенсорной потерей слуха.

В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или млекопитающее идентифицированы как носители мутации в гене отоферлина (например, посредством генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или человек был идентифицирован как имеющий мутацию в гене отоферлина и ему был поставлен диагноз бессимптомной нейросенсорной потери слуха. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов субъект или человек был идентифицирован как имеющий бессимптомную нейросенсорную потерю слуха.

В некоторых вариантах осуществления успешное лечение бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта может быть определено с использованием любого из традиционных функциональных слуховых тестов, известных в данной области техники. Неограничивающими примерами функциональных слуховых тестов являются различные типы аудиометрических тестов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тестирование среднего уха, акустические стволовые вызванные потенциалы и отоакустическая эмиссия).

В данном документе также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) в клетке млекопитающего, которые включают введение любой из описанных в данном документе композиций в клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих

способов клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления этих способов клетка млекопитающего представляет собой клетку человека (например, внутреннюю волосковую клетку улитки человека). В некоторых вариантах осуществления этих способов клетка млекопитающего находится в *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления этих способов клетка млекопитающего находится у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих способов клетка млекопитающего первоначально получают из организма млекопитающего и культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ранее было установлено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

Способы введения любой из описанных в данном документе композиций в клетку млекопитающего известны в данной области техники (например, посредством липофекции или посредством использования вирусного вектора, например, любого из вирусных векторов, описанных в данном документе).

Увеличение экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина), как описано в данном документе, например, по сравнению с контролем или уровнем экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) до введения вектора(-ов).

Способы определения экспрессии и/или активности отоферлина известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка отоферлина можно определять напрямую (например, обнаруживая белок отоферлин или обнаруживая мРНК отоферлина). Неограничивающие примеры способов, которые можно применять для непосредственного обнаружения экспрессии и/или активности отоферлина, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка отоферлина может быть обнаружена опосредованно (например, с помощью функциональных слуховых тестов).

Фармацевтические композиции и наборы

Фармацевтические композиции согласно данному изобретению могут содержать нуклеиновую кислоту, например, один или множество векторов на основе AAV, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции согласно данному изобретению в одном аспекте составлены для интракохлеарного введения. Композиции согласно данному изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

Предпочтительно терапевтические композиции составлены для интракохлеарного

введения. Необязательно, терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать липидные наночастицы. Необязательно, терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать полимерные наночастицы. Необязательно, терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать миникольцевые ДНК. Необязательно, терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать ДНК CELiD. Необязательно терапевтические композиции составлены так, чтобы содержат раствор синтетической перилимфы. Иллюстративный раствор синтетической перилимфы

содержит 20-200 mM NaCl; 1-5 mM KCl; 0,1-10mM CaCl₂; 1-10 mM глюкозы; и 2-50 mM HEPES, с pH от около 6 до около 9.

В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе композиций может дополнительно содержать один или более агентов, которые способствуют проникновению нуклеиновой кислоты или любого из векторов, описанных в данном документе, в клетку млекопитающего (например, липосому или катионный липид).

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе векторов может быть составлен с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из описанных в данном документе композиций могут включать, без ограничения, DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Пасадена, Калифорния), составы из Mirus Bio (Мэдисон, Висконсин) и Roche Madison (Мэдисон, Висконсин), полимерные составы PhaseRX, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Сиэтл, Вашингтон), DMRI/DOPE, полуксамер, адъювант VAXFECTIN® из Vical (Сан-Диего, Калифорния), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Пасадена, Калифорния), дендримеры и полимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA), полимеры RONDEL™ (РНКи/олигонуклеотидная доставка наночастиц) (Arrowhead Research Corporation, Пасадена, Калифорния) и pH-чувствительные сополимерные полимеры, такие как, без ограничения, полимеры, произведенные PhaseRX (Сиэтл, Вашингтон). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность в доставке олигонуклеотидов *in vivo* в клетку млекопитающего (см., например, deFougerolles, *Human Gene Ther.* 19:125-132, 2008; Rozema et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., *Cancer Res.* 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5715-5721, 2007). Любая из описанных в данном документе композиций может быть, например, фармацевтической композицией.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель (например, забуференный фосфатом физиологический раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы

легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому

подобное.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в любой из составов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления разовая доза любой из описанных в данном документе композиций может содержать общее суммарное количество по меньшей мере двух различных векторов, равное по меньшей мере 1 нг, по меньшей мере 2 нг, по меньшей мере 4 нг, около 6 нг, около 8 нг, по меньшей мере 10 нг, по меньшей мере 20 нг, по меньшей мере 30 нг, по меньшей мере 40 нг, по меньшей мере 50 нг, по меньшей мере 60 нг, по меньшей мере 70 нг, по меньшей мере 80 нг, по меньшей мере 90 нг, по меньшей мере 100 нг, по меньшей мере 200 нг, по меньшей мере 300 нг, по меньшей мере 400 нг, по меньшей мере 500 нг, по меньшей мере 1 мкг, по меньшей мере 2 мкг, по меньшей мере 4 мкг, по меньшей мере 6 мкг, по меньшей мере 8 мкг, по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 12 мкг, по меньшей мере 14 мкг, по меньшей мере 16 мкг, по меньшей мере 18 мкг, по меньшей мере 20 мкг, по меньшей мере 22 мкг, по меньшей мере 24 мкг, по меньшей мере 26 мкг, по меньшей мере 28 мкг, по меньшей мере 30 мкг, по меньшей мере 32 мкг, по меньшей мере 34 мкг, по меньшей мере 36 мкг, по меньшей мере 38 мкг, по меньшей мере 40 мкг, по меньшей мере 42 мкг, по меньшей мере 44 мкг, по меньшей мере 46 мкг, по меньшей мере 48 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 52 мкг, по меньшей мере 54 мкг, по меньшей мере 56 мкг, по меньшей мере 58 мкг, по меньшей мере 60 мкг, по меньшей мере 62 мкг, по меньшей мере 64 мкг, по меньшей мере 66 мкг, по меньшей мере 68 мкг, по меньшей мере 70 мкг, по меньшей мере 72 мкг, по меньшей мере 74 мкг, по меньшей мере 76 мкг, по меньшей мере 78 мкг, по меньшей мере 80 мкг, по меньшей мере 82 мкг, по меньшей мере 84 мкг, по меньшей мере 86 мкг, по меньшей мере 88 мкг, по меньшей мере 90 мкг, по меньшей мере 92 мкг, по меньшей мере 94 мкг, по меньшей мере 96 мкг, по меньшей мере 98 мкг, по меньшей мере 100 мкг, по меньшей мере 102 мкг, по меньшей мере 104 мкг, по меньшей мере 106 мкг, по меньшей мере 108 мкг, по меньшей мере 110 мкг, по меньшей мере 112 мкг, по меньшей мере 114 мкг, по меньшей мере 116 мкг, по меньшей мере 118 мкг, по меньшей мере 120 мкг, по меньшей мере 122 мкг, по меньшей мере 124 мкг, по меньшей мере 126 мкг, по меньшей мере 128 мкг, по меньшей мере 130 мкг, по меньшей мере 132 мкг, по меньшей мере 134 мкг, по меньшей мере 136 мкг, по меньшей мере 138 мкг, по меньшей мере 140 мкг, по меньшей мере 142 мкг, по меньшей мере 144 мкг, по меньшей мере 146 мкг, по меньшей мере 148 мкг, по меньшей мере 150 мкг, по меньшей мере 152 мкг, по меньшей мере 154 мкг, по меньшей мере 156 мкг, по меньшей мере 158 мкг, по меньшей мере 160 мкг, по меньшей мере 162 мкг, по меньшей мере 164 мкг, по меньшей мере 166 мкг, по меньшей мере 168 мкг, по меньшей мере 170 мкг, по меньшей мере 172 мкг, по меньшей мере 174 мкг, по меньшей мере 176 мкг, по меньшей мере 178 мкг, по меньшей мере 180 мкг, по меньшей мере 182 мкг, по меньшей мере

мере 184 мкг, по меньшей мере 186 мкг, по меньшей мере 188 мкг, по меньшей мере 190 мкг, по меньшей мере 192 мкг, по меньшей мере 194 мкг, по меньшей мере 196 мкг, по меньшей мере 198 мкг, или по меньшей мере 200 мкг, например, в буферном растворе.

Композиции, предложенные в данном документе, могут быть, например, составлены так, чтобы быть совместимыми с предполагаемым путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например, интракохлеарное введение).

В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции содержат липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции содержат полимерную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать миникольцевые ДНК. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции составлены так, чтобы содержать ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции составлены так, чтобы содержат раствор синтетической перилимфы. Иллюстративный синтетический раствор перилимфы содержит 20-200 mM NaCl; 1-5 mM KCl; 0,1-10 mM CaCl₂; 1-10 mM глюкозы; 2-50 mM HEPES, с pH от около 6 до около 9.

Также предложены наборы, содержащие любую из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать твердую композицию (например, лиофилизированную композицию, содержащую по меньшей мере два различных вектора, описанных в данном документе) и жидкость для сольюбилизации лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать предварительно заполненный шприц, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит флакон, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе (например, приготовленных в виде водной композиции, например, водной фармацевтической композиции).

В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции по выполнению любого из описанных в данном документе способов.

Пути введения

Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Также можно приготовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и жидкой до такой степени, что ее можно легко набрать с помощью шприца. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль

и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих веществ, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций, вводимых путем инъекции, может быть достигнуто путем использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Например для введения в водном растворе, раствор при необходимости должен быть подходящим образом забуферен и жидкий разбавитель сначала должен быть доведен до изотонического состояния добавлением достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим специалистам в данной области техники будет известна стерильная водная среда, которая может быть использована. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и или добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, или введена в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). В зависимости от состояния хозяина будет происходить некоторое изменение дозировки. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять подходящую дозу для каждого отдельного хозяина.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активного гAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными в данном документе, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем случае дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный базовый раствор, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются технологии вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

Раскрытые в данном документе композиции гAAV также могут быть приготовлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминогруппами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндаль и тому подобное. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды

натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и тому подобное. После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Используемый в данном документе термин «носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрывающие вещества, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтических активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным веществам и композициям, которые при введении в организм хозяина не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию.

Носители для доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и тому подобное, могут быть использованы для введения композиций согласно данному изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, трангены, доставляемые вектором на основе гAAV, могут быть составлены для доставки или инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, или в наночастице или тому подобное.

Такие составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых составов нуклеиновых кислот или конструкторов гAAV, раскрытых в данном документе. Получение и применение липосом, как правило, известно специалистам в данной области техники. Недавно были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке и периодами полувыведения из циркуляции (патент США № 5741516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосом и подобных липосомам препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США №№ 5567434; 5552157; 5565213; 5738868 и 5795587).

Липосомы успешно применялись с рядом типов клеток, которые, как правило, устойчивы к трансфекции при помощи других процедур. Кроме того, липосомы свободны от ограничений длины ДНК, которые типичны для систем доставки на основе вирусов. Липосомы были эффективно использованы для введения генов, лекарственных средств, радиотерапевтических агентов, вирусов, факторов транскрипции и аллостерических эффекторов в различные культивируемые клеточные линии и животных. Кроме того, было завершено несколько успешных клинических испытаний, изучающих эффективность доставки лекарственных средств с помощью липосом.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют мультислойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые мультислойными везикулами (MLV)). MLV, как правило, имеют диаметр

от 25 нм до 4 Тмкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащих водный раствор в ядре.

В качестве альтернативы можно использовать составы гAAV в виде нанокапсул. Нанокапсулы, как правило, могут удерживать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов из-за внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультратонкие частицы (размером около 0,1 Тмкм) должны быть сконструированы с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Предполагается использование биоразлагаемых наночастиц из полиалкилцианоакрилатов, которые отвечают этим требованиям.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы также рассматриваются в качестве альтернативных способов доставки композиций гAAV к хозяину. Сонофорез (т.е. ультразвук) был использован и описан в патенте США № 5656016 в качестве устройства для увеличения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в систему кровообращения и через нее. Другие предполагаемые альтернативы доставки лекарств включают внутрикостную инъекцию (патент США № 5779708), микроципы (патент США № 5797898), офтальмологические составы (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (патенты США №№ 5770219 и 5783208) и доставку с обратной связью (патент США № 5697899).

Ведение субъекту композиций может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции нуклеиновых кислот согласно данному изобретению вводят пациенту путем внутрикожной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции нуклеиновых кислот согласно данному изобретению вводят путем в/в инъекции.

Устройства и хирургические способы

В данном документе предложены терапевтические системы доставки для лечения глухоты и других заболеваний, нарушений и патологических состояний, связанных со слухом. В одном аспекте предложены терапевтические системы доставки, которые содержат: i) медицинское устройство, способное создавать один или более разрезов в мембране круглого окна внутреннего уха человека, нуждающегося в этом, и ii) эффективную дозу терапевтической композиции, содержащей один или более векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), при этом один или более

векторов на основе AAV способен образовывать матричную РНК полноразмерного полипептида слухового анализатора в целевой клетке внутреннего уха.

Средства для выполнения хирургического способа, при этом способ включает следующие стадии: введение внутрь улитки человеку, нуждающемуся в этом, эффективной

дозы терапевтической композиции по п. 1, причем терапевтическая композиция может вводиться с использованием медицинского устройства, содержащего а) средства для создания одного или множества разрезов в мембране круглого окна и б) эффективную дозу терапевтической композиции.

В данном документе предложены хирургические способы лечения потери слуха. В одном аспекте способы включают стадии: осуществления в улитке человека первого разреза в первой точке разреза; и введение внутрь улитки эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из композиций, описанных в данном документе), как предложено в данном документе. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию (например, любую из композиций, описанных в данном документе) вводят субъекту в первой точке разреза. В одном варианте терапевтическую композицию вводят субъекту в первый разрез или через него. В одном из вариантов терапевтическую композицию вводят субъекту к или через мембрану овального окна улитки. В одном из вариантов терапевтическую композицию вводят субъекту к или через мембрану круглого окна улитки. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В одном варианте осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В одном варианте осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, причем каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В одном варианте осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в данном документе.

Для оценки нуклеиновых кислот полипептидов слухового анализатора и конструкторов нуклеиновых кислот согласно изобретению также можно использовать другие анализы, включая те, что описаны в разделе «Примеры» в данном документе, а также те, которые известны в данной области техники.

Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области техники может получать и использовать соединения согласно данному изобретению и

осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты данного изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Характеристика гена отоферлина человека, гомологов, ортологов.

Ген отоферлина и соответствующая мРНК представлены ниже.

Пример 2: Конструирование вирусных векторов

Рекомбинантный AAV получают путем трансфекции безаденовирусным способом, используемым Xiao et al. *J Virol* 1999, 73(5):3994-4003. Цис-плазмиды с ITR AAV, транс-плазмиду с генами Rep и Cap AAV и вспомогательную плазмиду с незаменимой областью из генома аденовируса совместно трансфицируют в клетки 293 в соотношении 1:1:2. Используемые в данном документе векторы на основе AAV экспрессируют отоферлин человека или отоферлин мыши в рамках нескольких стратегий с двойными векторами с использованием описанных ниже конструкторов. Каждый из серотипов AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 готовят для инкапсуляции трех наборов конструкторов отоферлина для тестирования (i) стратегии конкатемеризации-транс-сплайсинга, (ii) стратегии гибридной интронно-гомологичной рекомбинации-транс-сплайсинга и (iii) стратегии экзонной гомологичной рекомбинации, как обобщено Pryadkina et al. *Meth Clin Devel* 2015, 2:15009.

Пример 3: Клонирование компонентов ОТОФ

Библиотеки олиго-dT и кДНК со случайным праймированием конструируют из поли(A)+мРНК всего плода человека, мозга взрослого человека, сердца, почек и сердца плода мыши, как описано Yasunaga et al. *Am J Genet* 2000, 67:591-600. Эксперименты ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК выполняют с этими библиотеками с использованием линкерных праймеров и ряда праймеров, выбранных из последовательности кДНК отоферлина. Продукты ПЦР непосредственно клонируют в вектор pGEM-T Easy и секвенируют. Для выделения длинной формы кДНК человека (7 т.п.н.) обратный праймер (5'-TTCACCTGGGCCCCGCA-GCATCCT-3' (SEQ ID NO: 29)) конструируют из последовательности, кодирующей аминокислотные остатки 63-70 первоначально описанной короткой формы отоферлина (Yasunaga et al., 1999) (GenBank 107403).

Общую РНК экстрагируют из улитки мыши с использованием способов, описанных в Strenzke et al., *EMBO J.* 35(23):2519-2535, 2016. В соответствии с набором GeneAmp RNA PCR, проводят эксперименты с ОТ-ПЦР с различными источниками мышинных и человеческих РНК. Две пары праймеров используются для восстановления мышинных кДНК, полученных из головного мозга и улитки, одна - из экзона 1 5'-UTR (5'-AGGCGTGTGAGCCACACTCCACCA-3' (SEQ ID NO: 30)) и экзона 22 (5'-CATAACCTCAGCTTGTCCCGAACA-3' (SEQ ID NO: 31)), а другая - из соединения экзонов 18-19 (5'-GGCCCCAGATCACGGACAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 32)) и 3'-UTR экзона 48 (5'-GGCCAGTACACCTGATTACACT-3' (SEQ ID NO: 33)). Чтобы восстановить всю

5'-часть длинной формы кДНК головного мозга человека, используют праймеры, полученные из 5'-UTR экзона 1 (5'-GGAGGAGGCAGCGGCAGAGAAGA-3' (SEQ ID NO: 34)) и экзона 22 (5'-TTCACCTGGGCCCCGCAGCATCCT-3' (SEQ ID NO: 35)).

Для стратегии конкатемеризация-транс-сплайсинга две кассеты составлены таким образом, что 5'-кассета содержит синтетический промотор, ориентированный на волосковые клетки, химерный интрон (β -глобин), консенсусную последовательность Козак, с 1-го по 26-й экзоны отоферлина и половину 26-го интрона отоферлина (представляет 3836 п.н., или 3494 п.н. кДНК отоферлина, соответствующих с 1-го по 26-й экзонам, плюс первые 342 п.н. интрона 26), а 3'-кассета содержит вторую половину 26-го интрона (342 п.н.), с 27-го по 48-й экзоны (3843 п.н.) отоферлина и последовательность сигнала полиаденилирования. В некоторых примерах промотор, ориентированный на волосковые клетки, не требуется для экспрессии белка отоферлина в слуховой внутренней волосковой клетке. Для стратегии интронно-гомологичной рекомбинации-сплайсинга кассеты из описанной выше стратегии конкатемеризации-сплайсинга модифицируются так, что полноразмерный 26-й интрон отоферлина добавляется вместо половины 26-го интрона в обеих плаزمидях.

Для стратегии экзонной гомологичной рекомбинации две кассеты составлены таким образом, что 5'-кассета содержит ориентированный на волосковые клетки промотор, химерный интрон, консенсусную последовательность Козак и с 1-го по 28-й экзоны (первые 3776 п.н. кДНК отоферлина), а 3'-кассета содержит с 23-го по 48-й экзоны (последние 4446 п.н. кДНК отоферлина) и последовательность сигнала полиаденилирования. Область гомологии между двумя кассетами составляет 885 п.н.

Пример 4: Создание и очистка вирусных частиц

Рекомбинантный AAV-1 получают с использованием протокола тройной трансфекции и очищают двумя последовательными градиентами плотности хлорида цезия (CsCl), как описано Pryadkina et al. *Mol Ther* 2015, 2:15009. В конце второго центрифугирования 11 фракций по 500 мкл извлекают из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищают диализом в $1 \times$ PBS. Фракции анализируют с помощью дот-блоттинга, чтобы определить те, которые содержат геномы rAAV. Количество вирусных геномов (вг) каждого препарата определяют методом количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома вектора на основе AAV (Bartoli et al. *Gene Ther* 2006, 13:20-28).

Пример 5: Составление вирусных частиц

AAV, продуцируемый с титром 1×10^{14} вг/мл, получают при разведении 3.2×10^{13} , 1.0×10^{13} , 3.2×10^{12} , 1.0×10^{12} вг/мл в искусственной перилимфе. Искусственную перилимфу получают путем объединения следующих реагентов в mM: NaCl, 120; KCl, 3,5; CaCl₂, 1,5; глюкозы, 5,5; NEPERES, 20. Искусственные перилимфы титруют NaOH, чтобы довести pH до 7,5 (общая концентрация Na⁺ 130 mM) (Chen et al. *J Controlled Rel* 2005, 110:1-19).

Пример 6: Демонстрация in vitro мРНК ОТОФ и продукции белка (антитело против ОТОФ)

Чтобы подтвердить, что векторы AAV-OTOF способны успешно трансдуцировали клетки млекопитающих *in vitro*, эпителиальные клетки сетчатки человека и эксплантаты улитки новорожденных мышей инкубируют с AAV-OTOF при титрах $3,2 \times 10^{13}$, $1,0 \times 10^{13}$, $3,2 \times 10^{12}$, $1,0 \times 10^{12}$, содержащих вирусный геном частиц (вг/мл) и анализируют на уровне ДНК, мРНК и белка отоферлина, как описано ранее (Duncker et al., 2013 *J Neurosci* 33(22):9508-9519. Антитела против отоферлина мыши получают от Abcam и используют, как описано Engel et al., 2006 *Neurosci* 143:837-849.

Пример 7: Описание устройства

Состав AAV-OTOF доставляют в улитку с помощью специального микрокатетера, предназначенного для последовательного и безопасного проникновения в МКО (мембрана круглого окна). Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий процедуру доставки, может войти в полость среднего уха через наружный слуховой проход и привести в контакт конец микрокатетера с МКО. Дистальный конец микрокатетера состоит по меньшей мере из одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон, которая создает перфорацию в МКО, достаточную для того, чтобы позволить AAV-OTOF проникнуть в кохлеарную перилимфу барабанной лестницы со скоростью приблизительно 1 мкл/мин, но заживает без хирургического восстановления. Оставшаяся часть микрокатетера, проксимальная к микроигле(-ам), загружена составом на основе AAV-OTOF/искусственной перилимфы с титром приблизительно 1-13 вг/мл. Проксимальный конец микрокатетера подсоединен к микроманипулятору, который позволяет проводить точные инфузии небольшого объема приблизительно 1 Тмкл/мин.

Пример 8: Животная модель 1: Старые мыши

Восстановление отоферлина с доставкой AAV-OTOF в улитку оценивается на трех мышинных моделях с нокаутом OTOF (мышинные модели, как описано в Longo-Guess et al. *Hearing Res* 2007, 234(1-2):21-28; Roux et al. *Cell* 2006, 127:277-289; и Reisinger et al., *J. Neurosci.* 31(13):4886-4895, 2011). Эксперименты по восстановлению тестируют на новорожденных (P1), ювенильных (P6 или P12) и взрослых (P42) мышах, чтобы оценить окно постнатального лечения относительно стадии развития улитки.

Исходные акустические стволовые вызванные потенциалы (АСВП) и оптоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения (ОАЭЧПИ) измеряются у молодых и взрослых мышей ($n=32$) с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (ВВК) и наружных волосковых клеток (НВК) до лечения. Ожидается, что все животные будут демонстрировать характерный аудиометрический профиль дисфункции отоферлина, т. е. аномальные АСВП на тестируемых звуковых частотах, но нормальные ОАЭЧПИ, что свидетельствует о дисфункциональной передаче сигнала ВВК и нормальной функции НВК (Yasunaga et al. 2000, *Am J Hum Genet* 67:591-600).

После измерений исходных АСВП и ОАЭЧПИ $0,3$ мкл AAV1-OTOF с титрами $1,0 \times 10^{13}$, $3,2 \times 10^{12}$ и $1,0 \times 10^{12}$ вг/мл вводят в левую барабанную лестницу ювенильных и взрослых мышей ($n=32$), как описано ниже. Эквивалентные титры вводят в левую барабанную лестницу неонатальных мышей, но в объеме $0,2$ мкл ($n=16$) (хирургическая процедура

описана ниже). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве неполучавшего лечения контроля. Измерения АСВП и ОАЭЧПИ снова проводят с двух сторон у ювенильных и взрослых животных через 1, 5 и 10 суток после хирургической процедуры. Через 4 недели (n=24) и 12 недель (n=24) после процедуры у всех животных в группах новорожденных, ювенильных и взрослых (всего n=48) проводят дополнительные двусторонние измерения АСВП и ОАЭЧПИ, после чего животных умерщвляют и извлекают их улитки.

У половины умерщвленных животных (n=4 из каждой из 4-недельных и 12-недельных групп после лечения) проводят иммуноокрашивание для идентификации структур волосковых клеток и оценки экспрессии белка ОТОФ вдоль сенсорного эпителия улитки. Как описано ранее используются антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519. На базальном, среднем и апикальном поворотах органа Корти общее количество волосковых клеток и волосковых клеток, экспрессирующих ОТОФ, подсчитывали в пределах 200 мкм областей; орган Корти по всей длине был разделен на три равных по длине части, обозначавших базальную, среднюю и апикальную области.

У оставшейся половины умерщвленных животных (у оставшихся 4 животных из каждой из 4-недельных и 12-недельных групп после лечения) образцы ткани улитки отбирают из тех же базальных, средних и апикальных областей, как описано выше, и анализируют на мРНК-транскрипт отоферлина, как описано ранее (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519, Heidrych et al. 2008, *Hum Mol Genet* 17:3814-3821, Heidrych et al., 2009, *Hum Mol Genet* 18:2779-2790).

Пример 9: Животная модель 1А: хирургический способ у старых мышей

AAV-ОТОФ, полученный в искусственной перилимфе, вводят в барабанную лестницу мышей, как описано Shu et al. 2016 (Shu Yilai, Tao Yong, Wang Zhengmin, Tang Yong, Li Huawei, Dai Pu, Gao Guanping, и Chen Zheng-Yi. *Human Gene Therapy*. June 2016, ahead of print. doi:10.1089/hum.2016.053). Шестинедельных мышей-самцов подвергают анестезии с помощью внутривенной инъекции ксилазина (20 мг/кг) и кетамина (100 мг/кг). Температура тела поддерживается на уровне 37 °C с помощью электрической грелки. В правой постаурикулярной области делается разрез и обнажается барабанная булла. Буллу перфорируют хирургической иглой, а небольшое отверстие расширяют, чтобы обеспечить доступ к улитке. Кость латеральной стенки улитки барабанной лестницы истончается с помощью бормашины, так что перепончатая латеральная стенка остается нетронутой. Микроинъекционная система Nanoliter в сочетании со стеклянной микропипеткой используется для доставки в общей сложности приблизительно 300 нл AAV-ОТОФ в искусственной перилимфе к барабанной лестнице со скоростью 2 нл/с. Стеклянную микропипетку оставляют на 5 минут после инъекции. После кохлеостомии и инъекции отверстие в барабанной перепонке закрывается зубным цементом, а мышцы и кожа зашиваются. Мышам дают проснуться от анестезии, и их боль контролируют с помощью 0,15 мг/кг гидрохлорида бупренорфина в течение 3 суток.

Пример 10: Животная модель 2: Поршневой микронасос для морских свинок Хирургическая процедура

AAV-ОТОФ, приготовленный в искусственной перилимфе, вводят морским свинкам для оценки распределения и токсичности после интракохлеарной доставки с помощью возвратно-поступательного микронасоса, как описано в Tandon et al. *Lab Chip* 2015 (DOI: 10.1039/c5lc01396h). Каждого из самцов морских свинок массой около 350 г (n=16) подвергают анестезии комбинацией пентобарбитала натрия (нембутал; 25 мг/кг, вводится внутривенно), фентанила (0,2 мг/кг, внутримышечно) и галоперидола (10 мг/кг, внутримышечно). Лидокаин с адреналином вводят подкожно в место разреза в качестве местного анестетика. При дорсальном подходе в булле делают отверстие диаметром 5 мм и производят кохлеостомию примерно на 0,5 мм дистальнее мембраны круглого окна. Канюлю микронасоса (описанная ниже) вводят в кохлеостому, продевают в улитку на 3 мм апикально и приклеивают к булле с помощью обычного цианоакрилатного клея. Для измерения суммарного потенциала действия (СПД) электрод из серебряной проволоки с перфторалкоксилановой изоляцией (диаметр без покрытия 203 мкм) вставляют рядом с нишей круглого окна и приклеивают к булле.

Процедуры измерения оптоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ОАЭЧПИ) и СПД выполняются, как описано ранее в Tandon et al. *Biomed Microdevices* 2015, 17:3-21. ОАЭЧПИ измеряют до и после процедуры кохлеостомии на характерных частотах: 32, 24, 16, 12, 8, 5,6, 4 и 2,78 кГц, чтобы отслеживать любые повреждения, возникающие в результате операции.

Описание микронасоса

AAV-ОТОФ с максимальным титром 1-14 вг/мл вводят морской свинке с помощью микронасоса, как описано в Tandon et al. *Lab Chip* 2015 (DOI: 10.1039/c5lc01396h). Система микронасоса имеет 4 выбираемых порта. Эти порты подключены к: (i) большому жидкостному конденсатору, используемому для хранения искусственной перилимфы; (ii) выходному отверстию, которое соединяется с улиткой; (iii) выходному отверстию из интегрированного резервуара AAV-ОТОФ; (iv) входному отверстию в интегрированный резервуар AAV-ОТОФ. Каждый порт по текучей среде связан с центральной насосной камерой, и каждый порт имеет отдельный доступ через клапан. Последовательность событий для возвратно-поступательной доставки AAV-ОТОФ следующая: (i) запускается внутренний цикл обновления AAV-ОТОФ, переносящий AAV-ОТОФ из резервуара AAV-ОТОФ в основную линию инфузии-отвода; (ii) AAV-ОТОФ вводится в улитку, и некоторое количество искусственной перилимфы отводится из накопительного конденсатора искусственной перилимфы; (iii) первые два этапа можно повторить несколько раз для дополнительных доз; (iv) после того, как AAV-ОТОФ дали возможность диффундировать в течение некоторого времени, объем перилимфы, который выводится из улитки, равен объему, введенному на этапах (i) - (iii), пополняя накопительный конденсатор искусственной перилимфы. Этот процесс приводит к фактической доставке лекарственного средства с нулевым чистым объемом жидкости, добавляемым в улитку.

Жидкостные конденсаторы в микронасосе представляют собой цилиндрические камеры, верхние стенки которых представляют собой тонкую (25,4 мкм) гибкую полиимидную мембрану. Насосная камера имеет диаметр 3,5 мм, жидкостный накопительный конденсатор имеет диаметр 14 мм, а все остальные конденсаторы имеют диаметр 4 мм. Одна и та же мембрана отклоняется, чтобы блокировать поток на каждом из клапанов. Клапанные камеры имеют диаметр 3,1 мм. Змеевидный канал, который включает резервуар с лекарственным средством, имеет квадратное поперечное сечение шириной 762 мкм и длиной 410 мм с общим объемом 238 мкл. Все остальные микроканалы в насосе имеют ширину 400 мкм и высоту 254 мкм.

Срочная доставка лекарств у морских свинок

В микронасос загружают AAV-ОТОФ и искусственная перилимфа, и канюлю вставляют в кохлеостому, сделанную в области улитки между точками с характеристической частотой чувствительностью 24 и 32 кГц, с апикальной резьбой 3 мм, оканчивающейся в области 12-16 кГц. Слуховые тесты на ОАЭЧПИ и СПД выполняются до начала инфузии AAV-ОТОФ/искусственной перилимфы. Затем включается насос и каждые 5 минут вводится около 1 мкл искусственной перилимфы, пока в улитку не будет доставлено в общей сложности около 10 мкл искусственной перилимфы. Через 20 минут ожидания из улитки выводится около 10 мкл перилимфы. Затем начинается доставка AAV-ОТОФ со скоростью около 1 мкл каждые 5 минут до тех пор, пока не будет доставлено в общей сложности около 10 мкл жидкости.

Животных умерщвляют через 1 неделю, 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев после лечения (n=4 на группу) и извлекают их улитки. Степень трансдукции AAV и экспрессии ОТОФ вдоль органа Корти оценивают посредством иммуноокрашивания антителами против ОТОФ. Антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a) и поддерживающих клеток (Sox2) используются для количественной оценки ВВК, НВК, поддерживающих клеток и морфологии стереоцилий. Окрашивание аннексином V используется для оценки доказательств апоптоза в клетках сенсорного эпителия улитки.

Пример 11: Животная модель 3: Токсичность у крупных животных, овец

AAV-ОТОФ, приготовленную в искусственной перилимфе, вводят молодым овцам для оценки распределения и токсичности после доставки в улитку с помощью транс-МКО инфузии. Исходные акустические стволы вызванные потенциалы (АСВП) и оптоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения (ОАЭЧПИ) измеряются у самок овец в возрасте 3 месяцев (n=40) с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (ВВК) и наружных волосковых клеток (НВК) до лечения. После измерений исходных АСВП и ОАЭЧПИ в левую барабанную лестницу овцы вводили 20 мкл AAV1-ОТОФ с титрами 1.0×10^{14} , 3.2×10^{13} , 1.0×10^{13} и 3.2×10^{12} вг/мл (n=10 на группу). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве не получающего лечения контроля. Измерения АСВП и ОАЭЧПИ снова проводят с двух сторон через 1, 5 и 10 суток после хирургической процедуры. Через 6 месяцев после процедуры у всех животных проводят дополнительные двусторонние измерения АСВП и ОАЭЧПИ, после чего животных умерщвляют и

извлекают их улитки.

У половины умерщвленных животных (n=5 из каждой группы доз) иммуноокрашивание проводится для идентификации структур волосковых клеток и для оценки экспрессии белка ОТОФ вдоль сенсорного эпителия улитки. Как описано ранее используются антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519). На базальном, среднем и апикальном поворотах органа Корти в пределах 200 мкм областей подсчитывают общее количество волосковых клеток и волосковых клеток, экспрессирующих ОТОФ.

У оставшейся половины умерщвленных животных (оставшихся 5 животных из каждой дозовой группы) образцы ткани улитки собирают из тех же базальных, средних и апикальных областей, как описано выше, и анализируют на транскрипт мРНК отоферлина, как описано ранее (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519, Heidrych et al. 2008, *Hum Mol Genet* 17:3814-3821, Heidrych et al., 2009, *Hum Mol Genet* 18:2779-2790).

Пример 12: Животная модель 3А: Созданная при помощи CRISPR модель трансгенных крупных животных (овцы)

Создание плазмиды, коэкспрессирующей Cas9 и оgРНК

Плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (плазида Addgene № 42230) расщепляют BspI, дефосфорилируют с использованием антарктической фосфатазы, а линейаризованный вектор очищают на геле. Для создания бицистронного вектора (pX330-cas9-ОТОФ), экспрессирующего Cas9 и оgРНК против ОТОФ, пару олигонуклеотидов для нацеливания на 1-й экзон отоферлина отжигают, фосфорилируют и лигируют с линейаризованным вектором (Cong et al. 2013 *Science* 339(6121):819-23).

Анализ редактирования генома в клетках

Клеточную линию астроглии овцы A15 (Vilette et al., 2000 *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36(1):45-9) культивируют в DMEM в 10% фетальной бычьей сыворотке, 2 mM глутамине, 1% пирувате натрия и 1% пенициллине/стрептомицине. Клетки трансфицируют в 24-луночных планшетах 2 мкг pX330-cas9-ОТОФ, коэкспрессирующей Cas9 и оgРНК против отоферлина, с использованием реагента липофектамина LTX. Три дня спустя геномную ДНК из трансфицированных клеток извлекают и количественно определяют с помощью спектрофотометра NanoDrop2000, измеряя соотношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} для оценки чистоты образца.

Активность мутации генов последовательности оgРНК в целевом локусе 1-го экзона ОТОФ количественно оценивают с использованием анализа на обнаружение несоответствия Т7Е1. Представляющую интерес последовательность ДНК амплифицируют с помощью ПЦР с помощью высокоточной полимеразы (гибридной полимеразы Herculase II) с использованием конкретных праймеров. Затем полученный продукт ПЦР денатурируют и медленно повторно отжигают (95 °C, 2 мин; от 95 °C до 85 °C, -2 °C/сек; от 85 °C до 25 °C, -1 °C/сек) для получения смеси гомодуплекс/гетеродуплекс. Затем его расщепляют 5 ед. рестрикционного фермента Т7Е1 при 37 °C в течение 30 минут. Продукты расщепления разделяют при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. Отношение расщепленных

продуктов к нерасщепленным использовали для расчета частоты NHEJ, как описано ранее, с использованием программного обеспечения Image J (Menoret et al. 2011 *Advanced protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual*. Heidelberg: Springer. p117-36). Частоты NHEJ рассчитывают как % модификации гена = $100 \times (1 - (1 - \text{расщепленная фракция})^{1/2})$.

Получение оgРНК и мРНК Cas9

Как описано ранее (Bellec et al., 2015, *Current Gene Ther*), промотор T7 добавляют к матрице оgРНК с помощью ПЦР-амплификации плазмиды pX330-cas9-OTOF. Продукт ПЦР очищают с использованием NucleoSpin Gel и PCR Clean-up. Он используется в качестве матрицы для транскрипции *in vitro* с использованием набора MEGAshortscript T7 в соответствии с руководством производителя. После завершения транскрипции проводят обработку ДНКазой I.

мРНК Cas9 транскрибируют с использованием расщепленной PmeI плазмиды экспрессии Cas9 JDS246 (плазмида Addgene № 43861) и набора для транскрипции mMACHINE T7 ULTRA в соответствии с руководством производителя. После завершения транскрипции проводят реакцию присоединения поли(А)-хвоста и обработку ДНКазой I. Как мРНК Cas9, так и оgРНК очищают с использованием набора MEGAclear и элюируют в буфере для элюирования.

Получение эмбрионов *in vitro*

Эмбрионы получают путем оплодотворения *in vitro* в соответствии со стандартной процедурой, описанной ранее (Crispo et al. 2014 *Transgenic Res*, 24(1):31-41). Вкратце, яичники с убойного цеха транспортируются в лабораторию, а ооцит-кумюлюсные комплексы (ОКК) аспирируют в среде для восстановления. Выбранные ОКК помещают в среду для созревания на 24 часа в 5% CO₂ в атмосфере увлажненного воздуха при 39 °C. Затем расширенные ОКК осеменяют каплями по 100 мкл с дозой 1×10^6 подвергнутой размораживанию спермы, выбранной путем восходящей миграции при помощи метода всплытия «swim-up». Оплодотворение выполняют в 5% CO₂ в увлажненной атмосферой при 39°C в течение 22 часов.

Микроинъекция в зиготы

Вскоре после оплодотворения 572 предполагаемые зиготы случайным образом распределяются по трем экспериментальным группам, подлежащим микроинъекции (группа CRISPR, n=200; и буферная группа, n=200) или не подлежащим микроинъекции (контрольная группа, n=200). Микроинъекцию для группы CRISPR выполняют в цитоплазму с использованием 5 нг/мкл оgРНК и 20 нг/мкл мРНК Cas9, разведенных в буфере для инъекций (10 mM Трис pH 7,5, 0,1 mM ЭДТК), тогда как буферной группе вводят по той же процедуре, но только с буфером. Наконец, инъецированные и неинъецированные эмбрионы переносятся в культуральную среду под минеральным маслом, в 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂ в увлажненной атмосфере при 39 °C. Скорость расщепления на 2 сутки (количество расщепленных зигот на общее количество ооцитов) и скорость развития на 6 сутки (морюлы и бластоцисты на общее количество ооцитов) регистрируют для всех экспериментальных групп. После 6-х суток ДНК 20 эмбрионов группы CRISPR

анализируют при помощи секвенирования по Сэнгеру для обнаружения мутации на уровне гена ОТОФ.

Для определения эффективности системы *in vivo* 53 бластоцисты, полученные с помощью микроинъекции CRISPR/Cas9 в зиготы, переносятся 29 самкам-реципиентам. На 6-е сутки после оплодотворения переносятся только ранние бластоцисты, бластоцисты и разросшиеся бластоцисты, классифицированные как отличные или хорошие (т. е. уровень 1 по определению в Stringfellow et al. 2010, *Manual of the International Embryo Transfer Society*). Перенос эмбрионов выполняют минимально инвазивным хирургическим вмешательством с помощью лапароскопии для помещения эмбрионов с краниальной стороны ипсилатерального рога матки к желтому телу. Овец-реципиентов предварительно синхронизируют с достижением 6-х суток эстрального цикла с использованием стандартного протокола для контроля овуляции, описанного ранее, как описано в Menchaca et al. 2004, *Reprod Fertil Dev.* 16(4):403-413.

Мониторинг плодов и ягнят

Диагностику беременности и развития плода проводят на 30-е и 105-е сутки, соответственно, с помощью ультразвукового исследования в В-режиме с датчиком 5 и 3,5 МГц. 0-е сутки эксперимента определяют как момент оплодотворения эмбриона. Для изучения развития плода на 105-е сутки беременности измеряют несколько параметров: грудной диаметр, бипариетальный размер головки плода, затылочно-носовую длину и частоту сердечных сокращений. При родах регистрировали продолжительность беременности, пол, ректальную температуру, частоту сердечных сокращений и дыхания, массу тела, периметр грудной клетки, бипариетальный размер головки плода, копчико-теменную и затылочно-носовую длину, высоту в холке, высоту в бедрах, ширину в бедрах и ширину в груди. Массу тела и морфометрические параметры определяют при рождении, а также через 15, 30 и 60 суток.

Идентификация и генотипирование трансгенных животных

Образцы кожи и мышц конечностей ягнят берут через семь суток после рождения и проводят анализ T7EI, вестерн-блоттинг и гистологические исследования, чтобы идентифицировать и охарактеризовать основателей с нокаутом и нецелевые участки. Общую ДНК выделяют из биоптатов кожи всех животных и из мышц некоторых животных. Образцы анализируют с помощью капиллярного электрофореза. Генотипирование 1-го экзона ОТОФ выполняется при помощи прямого секвенирования ПЦР ампликонов, а в биоптатах мышц - дополнительным секвенированием выделенных бактериальных клонов с отдельными последовательностями ампликонов.

Анализ экспрессии отоферлина

Вестерн-блоттинг проводят для определения присутствия миостатина в мышечном волокне. Равные количества общих белков анализировали с помощью электрофореза в 12% (об./об.) геле и электрофоретически переносят на мембрану из ПВДФ. Моноклональные мышечные антитела против отоферлина используют в вестерн-блоттинге. Промытые мембраны инкубируют с разведением 1:50000 вторичных антител, связанных с

пероксидазой хрена (ПХ). Активность ПХ определяют с помощью хемилюминесцентного вестерн-блоттинга.

Резервная терапия AAV-ОТОФ на модели трансгенных овец

AAV-ОТОФ, приготовленную в искусственной перилимфе, вводят трансгенным овцам с нокаутом ОТОФ для оценки способности восстанавливать нормальную функцию слуха после доставки в улитку посредством транс-МКО инфузии. Исходные акустические стволовые вызванные потенциалы (АСВП) и оптоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения (ОАЭЧПИ) измеряются у самок овец в возрасте 3 месяцев ($n=30$) с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (ВВК) и наружных волосковых клеток (НВК) до лечения. После измерений исходных АСВП и ОАЭЧПИ в левую барабанную лестницу овцы вводили 20 мкл AAV1-ОТОФ с титрами 1.0×10^{14} , 3.2×10^{13} and 1.0×10^{13} вг/мл ($n=10$ на группу). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве неполучавшего лечения контроля. Измерения АСВП и ОАЭЧПИ снова проводят с двух сторон через 1, 5 и 10 суток после хирургической процедуры. Через 6 месяцев после процедуры у всех животных проводят дополнительные двусторонние измерения АСВП и ОАЭЧПИ, после чего животных умерщвляют и извлекают их улитки.

У половины умерщвленных животных ($n=5$ из каждой группы доз) иммуноокрашивание проводится для идентификации структур волосковых клеток и для оценки экспрессии белка ОТОФ вдоль сенсорного эпителия улитки. Как описано ранее используются антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519). На базальном, среднем и апикальном поворотах органа Корти в пределах 200 мкм областей подсчитывают общее количество волосковых клеток и волосковых клеток, экспрессирующих ОТОФ.

У оставшейся половины умерщвленных животных (оставшихся 5 животных из каждой дозовой группы) образцы ткани улитки собирают из тех же базальных, средних и апикальных областей, как описано выше, и анализируют на транскрипт мРНК отоферлина, как описано ранее (Duncker et al. 2013, *J Neurosci* 33(22):9508-9519, Heidrych et al. 2008, *Hum Mol Genet* 17:3814-3821, Heidrych et al., 2009, *Hum Mol Genet* 18:2779-2790).

Пример 13: Клинический пример человека (педиатрическое лечение)

Пациент находится под общей анестезией. Хирург приближается к барабанной перепонке от наружного слухового прохода, делает небольшой разрез на нижнем крае наружного слухового прохода, где он встречается с барабанной перепонкой, и поднимает барабанную перепонку как лоскут, чтобы обнажить пространство среднего уха. Хирургический лазер используется для создания небольшого отверстия (примерно 2 мм) в основании стремени. Затем хирург проникает через мембрану круглого окна с помощью микрокатетера, заполненного раствором AAV-ОТОФ, приготовленного в искусственной перилимфе, с титром 1×10^{13} вг/мл. Микрокатетер подсоединен к микроманипулятору, который вводит приблизительно 20 мкл раствора AAV-ОТОФ со скоростью приблизительно 1 мкл/мин. По завершении инфузии AAV-ОТОФ хирург извлекает микрокатетер и закрывает отверстия в основании стремени и МКО пластырем из гель-пены.

Процедура завершается заменой лоскута барабанной перепонки.

Пример 14: Неинвазивное пренатальное тестирование материнской крови для обнаружения мутации ОТОФ

Образцы материнской крови (20-40 мл) отбирают в пробирки для сбора внеклеточной ДНК. По меньшей мере 7 мл плазмы выделяют из каждого образца с помощью протокола двойного центрифугирования при 2000 g в течение 20 минут, затем 3220 g в течение 30 минут с переносом супернатанта после первого вращения. вкДНК (внеклеточную ДНК) выделяют из 7-20 мл плазмы с использованием набора QIAGEN QIAmp Circulating Nuclei Acid и элюируют в 45 мкл буфера TE. Чистую материнскую геномную ДНК выделяют из лейкоцитарной пленки, полученной после первого центрифугирования.

Комбинируя термодинамическое моделирование анализов для выбора зондов с минимальной вероятностью взаимодействия зонд-зонд с подходами амплификации, описанными ранее (Stiller et al. 2009 *Genome Res* 19(10):1843-1848), может быть достигнуто мультиплексирование 11000 анализов. Образцы материнской вкДНК и материнской геномной ДНК предварительно амплифицируют в течение 15 циклов с использованием 11000 мишень-специфических анализов, и аликвоту переносят на вторую ПЦР-реакцию из 15 циклов с использованием вложенных праймеров. Образцы готовят для секвенирования путем добавления баркодированных меток в третьем 12-цикловом раунде ПЦР. Мишени включают SNP, соответствующие 100 мутациям в хромосоме 2, которые, как известно, приводят к потере функции отоферлина (Zhang et al. 2016 *Clin Genetics* Jan 27). Затем ампликоны секвенируют с использованием секвенатора Illumina HiSeq. Выравнивание последовательности генома выполняют с использованием имеющегося в продаже программного обеспечения.

Пример 15: Альтернативные примеры (мРНК, одиночный вирусный вектор, невирусные векторы)

Получение одиночного вирусного вектора

Мышиный отоферлин, лишенный N-концевых доменов, может восстановить фенотип с нокдауном у данио-рерио с нокаутом по отоферлину (Chatterjee et al. *Mol Cell Biol* 2015, 35(6):1043-1054). Однако у млекопитающих миссенс-мутации в доменах C2B и C2C были связаны с потерей слуха (Longo-Guess et al., 2007 *Hear Res*, 234:21-28; Mirghomizadeh et al., 2002 *Neurobiol Dis* 10:157-164), предполагая, что эти домены важны для нормальной функции отоферлина, связанной со слухом, у высших видов. Домен C2A отоферлина млекопитающих не связывает Ca^{2+} , тогда как все другие домены C2 связывают Ca^{2+} с умеренной (20-50 мкМ) или низкой (400-700 мкМ) аффинностью в отсутствие кислых липидов. Домены C2D и C2E связывают Ca^{2+} , а также фосфатидилсерин (ФС) Ca^{2+} -зависимым образом. Вырабатывается кДНК, которая кодирует усеченную форму отоферлина, лишенную доменов C2A, C2D и C2E. Эта кДНК подходит для упаковки в вектор на основе AAV.

Усеченный конструкт отоферлина (ОТОФАC2ADE) получен и клонирован из

исходной плазмиды отоферлина дикого типа, кодирующей полный ген ОТОF, как описано в Padmanarayana et al. 2014 *Biochem* 53:5023-5033. Делецию кодирующей области доменов C2 проводят с помощью ПЦР-мутагенеза с использованием охватывающих домен олигонуклеотидов и набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с применением подхода с двойным мутагенным праймером. Вкратце, ПЦР проводят следующим образом: 95°C в течение 3 минут; 18 циклов при 95°C в течение 15 секунд, 65°C в течение 1 минуты и 68°C в течение 12 минут; и 68 °C в течение 7 минут. Продукт ПЦР расщепляют с использованием DpnI, клонируют в вектор DSC-B и трансформируют в бактериальные клетки DH5alpha или XL10-Gold. Плазмидную ДНК выделяют с помощью мини-препаратов и затем секвенируют.

Для конструктора AAV используют плазмиду, содержащую промотор СВА, химерный интрон (β -глобин), консенсусную последовательность Козак, кДНК ОТОF Δ C2ADE и сигнальную последовательность полиаденилирования. Рекомбинантный AAV получают путем трансфекции безаденовирусным способом, используемым Xiao et al. *J Virol* 1999, 73(5):3994-4003. Цис-плазмиды с ITR AAV, транс-плазмиду с генами Rep и Cap AAV и вспомогательную плазмиду с незаменимой областью из генома аденовируса совместно трансфицируют в клетки 293 в соотношении 1:1:2. Каждый из серотипов AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 получают для инкапсулирования конструктора кДНК ОТОF Δ C2ADE.

Получение CELiD

Ген отоферлина подготавливают к невирусному переносу гена, как описано в Li et al. 2013, *PLoS ONE* 8(8):e69879. Сначала клетки Sf9 *Spodoptera frugiperda* выращивают в суспензии в бессывороточной среде. Ген бластицидин-S дезаминазы (bs) амплифицируют с помощью ПЦР из pIB/V5-His/CAT с использованием следующей пары праймеров:

5'-ATAAGCTTACGCTCAGTGGAACGAAAAC-3' (SEQ ID NO: 36) и
5'-ATAAGCTTGACGTGTCAGTGTCAGTCCTGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 37).

Продукт ПЦР длиной 865 п.н. расщепляют HindIII и лигируют в pFBGR, расщепленную HindIII. Клетки Sf9 трансфицируют pFBGR-bsd с использованием реагента для трансфекции Cellfectin. Через трое суток после трансфекции отбирают устойчивые к антибиотикам клетки путем добавления бластицидина-S HCl (50 мкг/мл) к питательной среде. Через две недели в селективной среде клоны, устойчивые к бластицидину (bsd^r), получают с помощью методов одноклеточного разведения или прямого переноса колоний. Клоны bsd^r размножают в среде для культивирования клеток насекомых с добавлением 10% FBS и бластицидин-S HCl (10 мкг/мл) в течение 2-3 дополнительных пассажей, затем возвращают в бессывороточную среду с 10 мкг/мл бластицидин-S HCl. После дополнительных 12 пассажей бластицидин-S HCl исключают из среды, а клеточные линии размножают для анализа. Для функционального скрининга клональные клеточные линии Sf9/ITR-ОТОF подвергают инфицированию (MOI=5) рекомбинантным бакуловирусом Vac-Rep, экспрессирующим белки Rep78 и Rep52 AAV 2-го типа, и анализируют на предмет индуцированной экспрессии ОТОF.

Клональные клетки Sf9/ITR-OTOF с наивысшими уровнями экспрессии OTOF размножают для получения ДНК CELiD-OTOF.

Клональные клетки Sf9/ITR-OTOF высевает при концентрации 2×10^6 клеток/мл и инфицируют Vac-Rep (MOI=от 1 до 3). Жизнеспособность и диаметр клеток контролируют ежедневно, пока диаметр клеток не увеличится до 18-20 мкм (диаметр неинфицированных клеток 14-15 мкм), что указывает на то, что клетки находятся на поздних стадиях вирусной инфекции. Внехромосомную ДНК экстрагируют из инфицированных Vac-Rep клеток Sf9/ITR-GFP с использованием имеющегося в продаже набора для выделения плазмид. Продукцию CELiD контролируют при помощи электрофореза в агарозном геле и окрашиванием внехромосомной ДНК бромидом этидия. ДНК CELiD продуцируется в исходных клетках Sf9 путем совместного инфицирования двумя отдельными бакуловирусными векторами экспрессии (BEV): Vac-Rep и вторым BEV, несущим трансген, фланкированный ITR, таким как Vac-OTOF. Инфицированные клетки Sf9 собирают, когда средний диаметр клеток увеличивается на 4-5 мкм, а процент жизнеспособности снижается до 80-90%. ДНК CELiD выделяют с использованием коммерчески доступного набора для очистки плазмид.

Клональные клетки Sf9/ITR-OTOF инокулируют различными количествами исходного Vac-Rep. Клетки периодически собирают, и внехромосомную ДНК выделяют с использованием имеющегося в продаже набора для выделения ДНК. Выделенную ДНК исследуют или при помощи электрофореза в агарозном геле, или при помощи ПЦР с парами праймеров, специфическими для OTOF, для количественного определения количества ДНК CELiD. Для вестерн-блоттинга клеточные белки фракционируют при помощи электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и переносят на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны инкубируют в блокирующем буфере (BB), состоящем из 5% обезжиренного сухого молока (масса: объем) в фосфатно-солевом буфере плюс 0,05% Tween-20 (PBST) в течение 1 часа при температуре окружающей среды с орбитальным перемешиванием. После промывки мембран в буфере для промывки (WB), состоящем из 3% обезжиренного сухого молока в PBST, мембраны инкубируют с соответствующим раствором первичных антител (разбавленным в BB) или при температуре окружающей среды (1 час), или при 4 °C (в течение ночи) с непрерывным орбитальным перемешиванием. Используются следующие первичные антитела и соотношения разведения: мышинное моноклональное антитело (мкАт) против Rep AAV; 2 мышинное мкАт против гликопротеина оболочки gp64 бакуловируса; мышинное мкАт против OTOF. После инкубации растворы первичных антител удаляют и мембраны промывают в WB (3×5 мин). Неконъюгированные мкАт инкубируют с раствором вторичных антител (конъюгатом козьих антител против мышинного иммуноглобулина с пероксидазой хрена (ПХ) в течение 1 часа, а затем промывали WB, как указано выше. Активность ПХ определяется по повышенной хемилюминесценции (ECL).

Липидные наночастицы

кДНК или мРНК отоферлина инкапсулируют в наночастицы сополимера молочной

и гликолевой кислоты с помощью метода испарения легколетучего растворителя из двойной эмульсии, описанного ранее (O'Donnell and McGinity 1997 *Adv Drug Delivery Rev* 28(1):25-42), и в липидные наночастицы (Pezzoli et al. 2013 *Methods Mol Biol* 1025:269-279). Вкратце, твердые липидные наночастицы можно получить из микроэмульсии с использованием Precirol АТО-5 и стеариламина в качестве катионного липида. 500 мг Precirol АТО-5 нагревают до температуры на 10°C выше его точки плавления и добавляют 10 мл горячего водного раствора полоксамера и стеариламина в различных пропорциях (1/1.25; 1/1,87; 1/3.12; 1/4,37 и 1/5). Образец перемешивают 30 минут при 14000 об/мин. Наночастицы образуются путем диспергирования горячей микроэмульсии в холодной воде (2-5 °C) в соотношении эмульсия: вода 1:5. Для извлечения наночастиц полученную суспензию трижды центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 минут при температуре 20 °C, восстанавливая осадок после центрифугирования. Катионные твердые липидные наночастицы лиофилизируют путем добавления водного раствора криопротектора (5% маннита) в соотношении 1:2 (SLN: маннит). В лиофилизаторе устанавливают температуру замораживания -40 °C, и образцы выдерживают при этой температуре в течение 2 часов. Затем устанавливают температуру лиофилизации 25°C при давлении 0,2-0,4 мБа в течение 48 часов. Раствор плазмиды кДНК ОТОФ готовят до концентрации 2 мкг/мкл. Затем 25 мкл раствора плазмидной ДНК добавляют к различным объемам суспензии катионных SLN для получения соотношений от 15:1 до 1:1 (SLN: ОТОФ) путем перемешивания.

Модифицированная РНК

Полинуклеотиды, первичные конструкторы мРНК (или модифицированная мРНК, или «ммРНК») для применения в соответствии с изобретением могут быть получены любым доступным способом, включая, помимо прочего, химический синтез, ферментативный синтез, который, как правило, называют транскрипцией *in vitro* (IVT), или ферментативное, или химическое расщепление более длинного предшественника и т. д. Способы синтеза РНК известны в данной области техники (см., например, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; and Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; обе из которых включены в данный документ посредством ссылки).

Процесс конструирования и синтеза первичных конструкторов согласно изобретению, как правило, включает стадии конструирования гена, продукции мРНК (с модификациями или без них) и очистки. В способе ферментативного синтеза сначала выбирают целевую полинуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес полипептид, для включения в вектор, который будет амплифицирован для получения матрицы кДНК. Необязательно, целевая полинуклеотидная последовательность и/или любые фланкирующие последовательности могут быть оптимизированы по кодонам. Затем матрицу кДНК используют для получения мРНК посредством транскрипции *in vitro* (IVT). После получения мРНК может подвергаться процессам очистки. Стадии которых описаны более подробно ниже.

Конструирование гена

Стадия конструирования гена может включать, но не ограничивается этим, синтез гена, амплификацию вектора, очистку плазмиды, линейаризацию и очистку плазмиды, а также синтез и очистку матрицы кДНК.

Синтез гена

После того, как представляющий интерес полипептид или мишень выбраны для продукции, создается первичный конструктор. В пределах первичного конструктора первая область связанных нуклеозидов, кодирующих представляющий интерес полипептид, может быть сконструирована с использованием открытой рамки считывания (ОРС) выбранного транскрипта нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). ОРС может включать ОРС дикого типа, изоформу, вариант или их фрагмент. Используемый в данном документе термин «открытая рамка считывания» или «ОРС» означает последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которая кодирует представляющий интерес полипептид. ОРС часто начинаются со стартового кодона, АТG, и заканчиваются нонсенс-или стоп-кодоном или сигналом. Кроме того, нуклеотидная последовательность первой области может быть оптимизирована по кодонам. Способы оптимизации кодонов известны в данной области техники и могут быть полезны в попытках достичь одной или более из нескольких целей. Эти цели включают соответствие частот кодонов в целевых организмах и организмах-хозяевах для обеспечения надлежащего сворачивания, сдвига в данных содержания GC для повышения стабильности мРНК или уменьшения вторичных структур, минимизации тандемных повторяющихся кодонов или базовых прогонов, которые могут нарушать конструирование или экспрессию генов, настройки области контроля транскрипции и трансляции, вставки или удаления последовательности переноса белков, удаления/добавления сайтов посттрансляционной модификации в кодируемых белках (например, сайтах гликозилирования), добавления, удаления или перетасовки белковых доменов, вставки или удаления сайтов рестрикции, модификации сайтов связывания рибосом и сайтов деградации мРНК, регуляции скорости трансляции, чтобы позволить различным доменам белка правильно сворачиваться, или уменьшать или устранять проблемные вторичные структуры в мРНК. В данной области техники известны инструменты, алгоритмы и сервисы оптимизации. Неограничивающие примеры включают сервисы от GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park, Калифорния) и/или проприетарные методы. В одном варианте осуществления последовательность ОРС оптимизируют с использованием алгоритмов оптимизации. В данной области техники известны варианты кодонов для каждой аминокислоты.

Стоп-кодона

В одном варианте осуществления первичные конструкторы согласно данному изобретению могут содержать по меньшей мере два стоп-кодона перед 3'-нетранслируемой областью (UTR). Стоп-кодон может быть выбран из TGA, TAA и TAG. В одном варианте осуществления первичные конструкторы согласно данному изобретению содержат стоп-кодон TGA и один дополнительный стоп-кодон. В другом варианте осуществления

дополнительный стоп-кодон может быть ТАА. В другом варианте осуществления первичные конструкторы согласно данному изобретению содержат три стоп-кодона.

Амплификация векторов

Затем вектор, содержащий первичный конструктор, амплифицируют, и плазмиду выделяют и очищают с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь этим, макси-препарат с использованием Invitrogen PURELINK™. HiPure Maxiprep Kit (Карлсбад, Калифорния).

Линеаризация плазмид

Затем плазмиду можно линеаризовать с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь ими, использование ферментов рестрикции и буферов. Реакция линеаризации может быть очищена с использованием способов, включая, например, PURELINK® PCR Micro Kit от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и способы очистки на основе ВЭЖХ, такие как, но не ограничиваясь ими, сильную анионообменную ВЭЖХ, слабую анионообменную ВЭЖХ, обращенно-фазовую ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) и ВЭЖХ с гидрофобным взаимодействием (ВЭЖХ-ГВ) и стандартный набор для ПЦР PURELINK™ от Invitrogen. (Карлсбад, Калифорния). Способ очистки может быть изменен в зависимости от масштаба проводимой реакции линеаризации. Затем линеаризованную плазмиду используют для создания кДНК для реакций транскрипции *in vitro* (IVT).

Синтез матрицы кДНК

Матрицу кДНК можно синтезировать, подвергнув линеаризованную плазмиду полимеразной цепной реакции (ПЦР). Конструирование праймер-зонда для любой амплификации находится в компетенции специалистов в данной области техники. Зонды также могут содержать химически модифицированные основания для повышения точности спаривания оснований с целевой молекулой и силы спаривания оснований. Такие модификации могут содержать 5-метилцитидин, 2,6-диаминопурин, 2'-фтор, фосфотиоат или закрытые нуклеиновые кислоты.

Получение мРНК

Процесс получения мРНК или ммРНК может включать, но не ограничивается этим, транскрипцию *in vitro*, удаление матрицы кДНК и очистку РНК, а также реакции кэпирования и/или присоединения хвоста мРНК.

Транскрипция *in vitro*

Полученная ранее кДНК может быть транскрибирована с использованием системы транскрипции *in vitro* (IVT). Система, как правило, содержит транскрипционный буфер, нуклеотидтрифосфаты (НТФ), ингибитор РНКазы и полимеразу. НТФ могут быть получены самостоятельно, могут быть выбраны у поставщика или могут быть синтезированы, как описано в данном документе. НТР могут быть выбраны, но не ограничиваются ими, среди тех, что описаны в данном документе, включая природные и неприродные (модифицированные) НТФ. Полимераза может быть выбрана, но не ограничивается ими, из РНК-полимеразы Т7, РНК-полимеразы Т3 и мутантных полимераз,

таких как, но не ограничиваясь ими, полимеразы, способные содержать модифицированные нуклеиновые кислоты.

5'-кэпирование

Структура 5'-кэп мРНК участвует в ядерном экспорте, повышая стабильность мРНК. Он связывает мРНК кэп-связывающего белка (СВР), который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции за счет ассоциации СВР с поли(А)-связывающим белком с образованием соединений зрелых циклических мРНК. Кэп также способствует удалению 5' проксимальных интронов во время сплайсинга мРНК. Эндогенные молекулы мРНК могут иметь 5'-конец, кэпирующий, с образованием 5'-ppp-5'-трифосфатной связи между концевым остатком гуанозинового кэпа и 5'-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Затем этот 5'-гуанилатный кэп может быть метилирован с образованием N7-метилгуанилатного остатка. Рибозные сахара терминальных и/или предтерминальных транскрибируемых нуклеотидов 5'-конца мРНК необязательно также могут быть 2'-О-метилованными. 5'-декэпирование посредством гидролиза и расщепления структуры гуанилатного кэпа может нацеливаться на молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, для деградации. Модификации полинуклеотидов, первичных конструкторов и ммРНК согласно данному изобретению могут создавать негидролизующую кэп-структуру, предотвращающую декэпирование и, таким образом, увеличивая период полужизни мРНК. Поскольку гидролиз кэп-структуры требует расщепления 5'-ppp-5' фосфородиэфирных связей, модифицированные нуклеотиды можно использовать во время реакции кэпирования. Например, кэпирующий фермент вируса осповакцины от New England Biolabs (Ипсвич, штат Массачусетс), можно использовать с нуклеотидами альфа-тиогуанозина в соответствии с инструкциями производителя для создания фосфоротиоатной связи в 5'-ppp-5'-кэп. Могут быть использованы дополнительные модифицированные гуанозиновые нуклеотиды, такие как α -метилфосфонат и селенофосфатные нуклеотиды. Дополнительные модификации включают, но не ограничиваются ими, 2'-О-метилирование рибозных сахаров 5'-терминальных и/или 5'-предтерминальных нуклеотидов мРНК (как упомянуто выше) на 2'-гидроксильной группе сахарного кольца. Для создания 5'-кэпа молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула мРНК, можно использовать несколько различных структур 5'-кэп.

Фланкирующие области, нетранслируемые области (UTR)

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5'-UTR начинается в сайте начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не включает стартовый кодон, тогда как 3'-UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала завершения транскрипции. UTR могут быть включены в полинуклеотиды, первичные конструкторы и/или мРНК согласно данному изобретению для повышения стабильности молекулы. UTR также должны быть включены для обеспечения контролируемого снижения экспрессии транскрипта в случае их неправильного направления на нежелательные участки органов.

5'-UTR и инициация трансляции

Путем конструирования признаков, как правило, обнаруживаемых в экспрессируемых в большом количестве генах конкретных целевых органов, можно повысить стабильность и продукцию белка из полинуклеотидов, первичных конструкторов или мРНК согласно данному изобретению. Например, последовательности интронов или частей интронов могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов, первичных конструкторов или мРНК согласно данному изобретению.

Богатые AU элементы

Богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., Mol. Cell Biol. 15:5777-5788, 1995; Chen et al., Mol. Cell Biol. 15:2010-2018, 1995): ARE класса I содержат несколько рассеянных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. C-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II имеют два или более перекрывающихся девятизвенных полимеров UUAUUUA(U/A)(U/A) (SEQ ID NO: 38). Молекулы, содержащие этот тип ARE, включают GM-CSF и TNF-альфа. ARE класса III менее четко определены. Эти богатые U области не содержат мотив AUUUA. c-Jun и миогенин представляют собой два хорошо изученных примера этого класса. Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют матрицу, тогда как было зарегистрировано, что члены семейства ELAV, особенно HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование сайтов связывания, специфических для HuR, в 3'-UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, стабилизации матричной РНК *in vivo*. Введение, удаление или модификация 3'-UTR богатых AU-элементов (ARE) можно использовать для модуляции стабильности полинуклеотидов, первичных конструкторов или мРНК согласно изобретению. При конструировании специфических полинуклеотидов, первичных конструкторов или мРНК можно ввести одну или более копий ARE, чтобы сделать полинуклеотиды, первичные конструкторы или мРНК согласно данному изобретению менее стабильными и тем самым снизить трансляцию и уменьшить продукцию полученного белка. Точно так же ARE можно идентифицировать и удалять или мутировать для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличения трансляции и продукции полученного в результате белка. Эксперименты по трансфекции можно проводить в соответствующих клеточных линиях с использованием полинуклеотидов, первичных конструкторов или мРНК согласно изобретению, а продукцию белка можно анализировать в различные моменты времени после трансфекции. Например, клетки можно трансфицировать различными молекулами ARE-инженерии и с помощью набора для ИФА для соответствующего белка и анализируемого белка, продуцируемого через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов и 7 суток после трансфекции. Полинуклеотид, первичная конструкция и мРНК согласно данному изобретению могут быть составлены с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть использованы для доставки, включают, но не ограничиваются ими, составы DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Пасадена, Калифорния) от

MIRUS® Bio (Мэдисон, Висконсин) и Roche Madison (Мэдисон, Висконсин), полимерные составы PHASERX™, такие как, без ограничения, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™ (PHASERX®, Сиэтл, Вашингтон), DMRI/DOPE, поллоксамер, адъювант VAXFECTIN® от Vical (Сан-Диего, Калифорния), хитозан, циклодекстрин от Calando Pharmaceuticals (Пасадена, Калифорния), дендримеры и полимеры сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA). Полимеры RONDEL™ (доставка РНКи/олигонуклеотидных наночастиц) (Arrowhead Research Corporation, Пасадена, Калифорния) и pH-чувствительные блок-сополимеры, такие как, но не ограничиваясь этим, PHASERX® (Сиэтл, Вашингтон). Многие из этих подходов с использованием полимеров продемонстрировали эффективность в доставке олигонуклеотидов *in vivo* в цитоплазму клетки (обзор см. в deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; полностью включенной в данный документ посредством ссылки). Два подхода с использованием полимеров, которые обеспечили надежную доставку нуклеиновых кислот *in vivo*, в данном случае с короткой интерферирующей РНК (киРНК), представляют собой динамические поликонъюгаты и наночастицы на основе циклодекстрина. В первом из этих подходов доставки используются динамические поликонъюгаты и, как было показано *in vivo* на мышах, эффективно доставляет киРНК и подавляет эндогенную целевую мРНК в гепатоцитах (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; полностью включена в данный документ посредством ссылки). Этот конкретный подход относится к многокомпонентной полимерной системе, ключевые особенности которой включают мембранно-активный полимер, с которым нуклеиновая кислота, в данном случае киРНК, ковалентно связана посредством дисульфидной связи, и где как ПЭГ (для маскировки заряда), так и N-ацетилгалактозаминовые (для нацеливания на гепатоциты) группы связаны посредством pH-чувствительных связей (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; полностью включена в данный документ посредством ссылки). При связывании с гепатоцитом и входе в эндосому полимерный комплекс распадается в среде с низким pH, при этом полимер раскрывает свой положительный заряд, что приводит к выходу из эндосомы и высвобождению киРНК из полимера в цитоплазму. Было показано, что путем замены N-ацетилгалактозаминовой группы на маннозную группу можно изменить нацеливание с гепатоцитов, экспрессирующих асиалогликопротеиновый рецептор, на синусоидальный эндотелий и клетки Купфера. Другой подход с использованием полимеров включает использование нацеленных на трансферрин циклодекстринсодержащих поликатионных наночастиц. Эти наночастицы продемонстрировали целенаправленный сайленсинг для продукта гена EWS-FLI1 в опухолевых клетках саркомы Юинга, экспрессирующих рецептор трансферрина (Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 2005 65: 8984-8982; полностью включена в данный документ посредством ссылки), а киРНК, которые составляли в эти наночастицы, хорошо переносились отличными от людей приматами (Heidel et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007 104:5715-21; полностью включена в данный документ посредством ссылки). Обе эти стратегии доставки включают рациональные подходы, в которых используются механизмы как направленной доставки, так и механизмы

эндосомального высвобождения.

Пример 16 - Восстановление слуха у *Otof*^{-/-} мышей при помощи подхода транс-сплайсинга

Был проведен эксперимент, чтобы определить, можно ли восстановить слух у *Otof*^{-/-} мышей с использованием комбинации двух разных векторов с использованием описанных в данном документе способов.

Материалы и способы

Клонирование

Вариант 4 транскрипта кДНК отоферлина мыши (KX060996; кодирующая последовательность ДНК (CDS), идентичная эталонной последовательности NM_001313767), который был субклонирован из кДНК улитки (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535), был субклонирован в остов для получения AAV с использованием стандартных стратегий клонирования, включая рестрикционное расщепление и лигирование. Оба вектора содержат ITR серотипа 2. Энхансер CMV и промотор α -актина человека были субклонированы в 5'-вектор, который содержит кДНК eGFP и сигнал P2A (Фиг. 1). CDS отоферлина была разделена в месте стыка 21-й экзон- 22-й экзон на две половины примерно одинакового размера. 5'-вектор кодирует N-концевую часть отоферлина с 1-й по 844-ю аминокислоту, 3'-вектор содержит кодирующую последовательность для аминокислот с 845-й по 1977-ю и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) и сигналы полиаденлирования.

Для подхода транс-сплайсинга донорный сайт сплайсинга (Trapani et al. (2014) EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014) следует за кодирующей последовательностью в 5'-векторе. В 3'-векторе акцепторный сайт сплайсинга был субклонирован непосредственно перед кодирующей последовательностью для отоферлина. В кодирующую последовательность была введена молчащая мутация, создавая дополнительный сайт для рестрикционного расщепления.

Для гибридного подхода рекомбиногенная область фага F1 для гомологичной рекомбинации была субклонирована сразу после донорного сайта сплайсинга в 5'-векторе и перед акцепторным сайтом сплайсинга 3'-вектора (Фиг. 2). Идентичность плазмид проверяли при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Получение и очистка вирусов

Двойные векторы на основе AAV получали путем транзientной трансфекции клеток HEK293, выращенных на многоуровневых клеточных фабриках. Клетки были совместно трансдуцированы вспомогательными плазмидами для продукции вируса, кодирующего капсидные белки серотипа 6. Очистку клеточных лизатов проводили при помощи ультрацентрифугирования в градиенте плотности йодиксанола с последующей стадией второй очистки и концентрирования с помощью аффинной хроматографии ЖХБР (жидкостная хроматография быстрого разрешения) (Asai et al. (2015) Nat. Neurosci. 18 1584-1593; Tereshchenko et al. (2014) Neurobiol. Dis. 65 35-42). Для подхода транс-сплайсинга 5'-вектор достиг концентрации $\sim 2.8 \times 10^8$ трансдуцирующих единиц/мкл. 3'-вектор достиг $\sim$

$1,4 \times 10^8$ трансдуцирующих единиц/мкл. Для гибридного подхода оба вируса очищали одновременно в одних и тех же растворах, достигая несколько более высоких титров вируса.

Линии мышей

Мышей с нокаутом по отоферлину (*Otof*^{-/-}) получали, как описано (Reisinger et al. (2011) J. Neurosci. 31 4886-4895), и подвергали обратному скрещиванию в течение по меньшей мере 5 поколений или линии C57/Bl6N, или линии CD1. Для инъекции вируса использовали потомство F1 от *Otof*^{-/-} самок CD1 и *Otof*^{-/-} самцов C57/Bl6N. Для контроля дикого типа *Otof*^{+/+} мышей из разведения *Otof*^{+/+} C57/Bl6N скрещивали с мышами CD1 дикого типа (Charles River).

Инъекция вируса

Мышей на 6-7 сутки постнатального развития (P6-7) подвергали анестезии с использованием 2,5-5% изофлурана. Кожа позади левой буллы была вскрыта и открылась ниша круглого окна. Раствор вируса в стеклянном капилляре вводили через мембрану круглого окна с помощью микроинжектора PLI-100A BASIC PICOLITER (Harvard Apparatus GmbH, Германия) в качестве источника давления, тем самым вводя около 0,2-0,5 мкл раствора во внутреннее ухо (Jung et al. (2015) EMBO J. 34 2686-2702). Кожу ушивали, и мышат выращивали их матери.

Иммуногистохимия

Иммуноокрашивание проводили, как описано ранее (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). После декапитации были изолированы височные кости, открыта часть костного выступа улитки и перфорировано круглое окно. Височные кости фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS в течение 45 мин при 4 °C. Улитки мышей старше P20 декальцинировали или в течение 5 минут в растворе Морзе, или в течение 2 суток в 0,12 M растворе ЭДТК. Блокирование проводили с использованием 17% нормальной козьей сыворотки, 0,3% Triton X-100, 0,45 mM NaCl и 20 mM фосфатного буфера, pH 7,4. Антитела разводили в блокирующем растворе и наносили на орган Корти, расположенный в височных костях, перед иссечением апикального и базального поворотов. Использовали следующие антитела: козий IgG1 против Ctb2, мышинное антитело против отоферлина (RRID: AB_881807, Abcam, Кембридж, Великобритания, 1:300), кроличье антитело против отоферлина (Synaptic Systems, Геттинген, Германия, 1:100), козье антитело против кальбиндина D28k и вторичные антитела, меченные Alexa Fluor®405, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®568, Alexa Fluor®594 и AlexaFluor647 (Invitrogen, 1:200). Изображения конфокальной микроскопии получали в виде стопки 2D-изображений с размером шага 0,6 мкм с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Leica TCS SP5, Leica Microsystems CMS GmbH, Мангейм, Германия) с иммерсионным глицериновым объективом с 63-кратным увеличением (NA=1,456). Количество синапсов в 14-16-суточных внутренних волосковых клетках (ВВК) подсчитывали с использованием модуля для подсчета клеток в программе ImageJ как количество пятен Ctb2. Анализ изображений для определения фракционных уровней мембраносвязанного отоферлина описан в Strenzke et

al. (2016a) EMBO J. 35 2519-2535).

Электрофизиология

Ca^{2+} -токи и емкость плазматической мембраны в ВБК измеряли с помощью фиксации потенциала ВБК от верхушечных завитков свежеизвлеченных органов Корти в конфигурации перфорированного пэтч-клампа при комнатной температуре (20-25 °C), как описано (Moser & Beutner (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97 883-888). Раствор для пипетки содержал 130 mM Cs-глюконата, 10 mM тетраэтиламмонийхлорида (TEA-Cl), 10 mM 4-аминопиридина (Merck, Дармштадт, Германия), 1 mM MgCl_2 , 10 mM Cs-HEPES (pH 7,17, осмолярность прибл. 290 мОсм), 300 мкг/мл амфотерицина В (Calbiochem, Ла-Хойя, Калифорния). Внеклеточный раствор содержал 110 mM NaCl, 35 mM TEA-Cl, 2,8 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Na-HEPES, 1 mM CsCl, 11,1 mM D-глюкозы (pH 7,2, осмолярность приблизительно 300 мОсм). Если не указано иное, все химические вещества были получены от Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия). Усилитель ЕРС-9 (НЕКА Electronics, Ламбрехт, Германия), управляемый программным обеспечением *Pulse*, использовали для выборки и фильтрации токов на 20 кГц и 5 кГц, соответственно. Потенциалы были скорректированы на потенциалы жидкостного соединения (-14 мВ). ΔCm измеряли с использованием деполяризации разной продолжительности до пикового потенциала Ca^{2+} -тока с интервалами между стимулами 30-60 секунд, как описано ранее (Beutner & Moser (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97 883-888). Все токи корректировали с поправкой на утечку с использованием протокола Р/6. Скорость пополнения везикул рассчитывали как ΔCm во время деполяризации в 100 мс минус ΔCm при деполяризации в 20 мс, деленная на 45 аФ на везикулу (Neef et al. (2007) The Journal of Neuroscience 27 12933-12944), чтобы получить количество везикул. Количество активных зон на клетку определяли с помощью иммуногистохимии (10 синапсов для трансдуцированных *Otof*^{-/-} ВБК, 14 синапсов для *Otof*^{+/+} ВБК).

Регистрация АСВП

Акустические стволовые вызванные потенциалы регистрировали как описано в (Jing et al. (2013) J Neurosci 33 4456-4467).

Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР и секвенирование

Общую РНК выделяли из недавно препарированных органов Корти с помощью набора для очистки РНК Invitrogen™ TRIzol™ Plus (Thermo Fisher Scientific, 12183555) в соответствии с инструкциями производителя и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием системы синтеза первой цепи SuperScript® IV (ThermoFisher Scientific, 18091050) с олиго(дТ)₂₀ и случайными гексамерными праймерами. Далее кДНК использовали в реакциях ПЦР-амплификации с использованием DreamTaq® Polymerase (Thermo Fisher Scientific, EP0702), используя следующие праймеры:

N-концевой фрагмент 3'-CCCACAAGGCCAACGAGACGGATGAGGAC-5' (SEQ ID NO: 24) и 3'-AAGAGGCTTCGGGCCTGATACATGTGTGCT-5' (SEQ ID NO: 25);

Фрагмент сборки 3'-ACGGCAATGAAGTCGATGGTATGTCCCGGC-5' (SEQ ID NO: 26);

С-концевой фрагмент 3'-CTGACCTGCCACCCATCAATGGCCCAGTGG-5' (SEQ ID NO: 27) и 3'-СТАТГCGCTCCTCCTCTGTGGAGCCATCCT-5' (SEQ ID NO: 28).

Все полосы вырезали, клонировали в вектор pCR2.1™ -ТОРО® с использованием набора для клонирования ТОРО® ТА® (Thermo Fisher Scientific, 450641) и вводили в клетки *E. coli* One Shot™ TOP10 Electrocomp™ (Thermo Fisher Scientific, C404050). Все клоны были проверены на правильность вставки и подтверждены при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Результаты

Для тестирования подхода транс-сплайсинга были созданы двойные векторы на основе AAV, каждый из которых содержит половину CDS отоферлина. В первом векторе промотор бета-актина человека и энхансер CMV использовали для управления экспрессией eGFP и 5'-фрагмента отоферлина, разделенных последовательностью P2A (Фиг. 1). Второй вектор содержал CDS 3' отоферлина и стабилизирующие мРНК элементы. Векторы на основе AAV претерпели мультимеризацию от головы к хвосту в ядрах целевых клеток за счет негомологичного соединения концов инвертированных концевых повторов (ITR), тем самым способствуя сборке двух векторных геномов. Донорный сайт сплайсинга в 5'-векторе и акцепторный сайт сплайсинга в 3'-векторе были включены для ускорения процессинга правильной мРНК полноразмерного отоферлина (Фиг. 1).

Otof^{-/-} животным с нокаутом по отоферлину на 6-7 сутки постнатального развития (P6-7) совместно вводили оба AAV (~ 1,4-2,8×10⁸ трансдуцирующих единиц/мкл) через мембрану круглого окна левого уха (Фиг. 3). Неинъецированные *Otof*^{-/-} однопометники и животные дикого типа, некоторым из которых вводили AAV, кодирующие eGFP, служили в качестве контроля. На P23-28 слух тестировали с использованием регистрации акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП), а частоту трансдукции внутренних волосковых клеток (ВВК) и уровни экспрессии отоферлина определяли с помощью иммуногистохимии. Как показано на Фиг. 3, у нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} мышей в записях АСВП выявили заметный суммационный потенциал (СП) из-за деполяризации ВВК, но эти сигналы не были переданы в ствол мозга, что привело к плоской линии. После двойной трансдукции AAV у мышей наблюдались типичные волны АСВП, указывающие на то, что слуховая информация обрабатывалась в стволе мозга.

В ответ на щелчки пороги в успешно трансдуцированных ушах составляли 54 ± 3 дБ (диапазон: 30-70 дБ). В контрольных экспериментах у нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} однопометников не наблюдали никаких волн АСВП, за исключением суммационного потенциала, даже при звуковом стимуле 100 дБ. Стимулы чистого тона вызывали ответы АСВП в большинстве трансдуцированных ушей, но не в контрольной группе *Otof*^{-/-} однопометников, не подвергавшихся трансдукции (Фиг. 3-6). АВР чистого тона были обнаружены для низких (6 кГц), средних (12 кГц) и высоких частот (24 кГц). *Otof*^{+/+} контроли продемонстрировали нормальные формы волны АСВП с пороговым значением 39 ± 1 дБ (диапазон: 30-40 дБ) (Фиг. 4 и 5). Как показано на Фиг. 4, амплитуды волн АСВП у трансдуцированных *Otof*^{-/-} мышей меньше, чем у *Otof*^{dm/dm} мышей дикого типа,

трансдуцированных двойным AAV с усиленным зеленым флуоресцентным белком (eGFP).

Чтобы проверить правильность конкатемеризации и повторной сборки мРНК полноразмерного отоферлина в правильной ориентации, мРНК выделяли из трансдуцированных и нетрансдуцированных P14 *Otof*^{-/-} органов Корти. После обратной транскрипции в кДНК были амплифицированы три фрагмента мРНК отоферлина: один, кодируемый 5' вирусом, один кодируемый 3' вирусом, и один фрагмент, покрывающий сайт сборки двух векторов. Секвенирование по Сэнгеру ПЦР ампликонов выявило правильные транскрипты отоферлина, содержащие молчащую мутацию отоферлина, трансдуцированного вирусом, что указывает на правильную сборку трансдуцированной двойным AAV мРНК отоферлина.

Чтобы определить частоту трансдукции внутренних волосковых клеток (ВВК) и уровни экспрессии отоферлина, органы Корти были извлечены на P18-28 и проанализированы иммуногистохимически с использованием двух антител против отоферлина, одно из которых связывается с N-концевой частью, а другое связывается с самой С-концевой частью отоферлина (Фиг. 6 и Фиг. 7). Как показано на Фиг. 7, кальбиндин использовали в качестве маркера внутренних и наружных волосковых клеток. Клетки, экспрессирующие eGFP, указывали на вирусную трансдукцию по меньшей мере 5' вируса. Окрашивание антителом против отоферлина (Abcam) в N-концевой половине отоферлина указывает на экспрессию N-концевой части отоферлина. Окрашивание антителом против С-концевого отоферлина (Synaptic Systems) указывает на экспрессию С-концевой части отоферлина. В целом все три панели на Фиг. 7 продемонстрировали, что полноразмерный отоферлин экспрессируется в ВВК. От двенадцати до пятидесяти одного процента (в среднем $32 \pm 4\%$, СОС) ВВК продемонстрировали экспрессию полноразмерного отоферлина с более высокими частотами трансдукции ВВК в верхушке улитки (низкочастотная область, частота трансдукции $35 \pm 5\%$; диапазон: 19 -52%), чем в базальном повороте ($24 \pm 6\%$, диапазон: 0-51%). Около 10% всех ВВК продемонстрировали сигнал N-концевой части отоферлина, но не продемонстрировали экспрессию С-концевой части отоферлина, что предположительно указывает на трансдукцию только 5'-вектора. У *Otof*^{-/-} однопометников из контрольной группы сигнала не наблюдали. Примечательно, что сигнал как N-концевой, так и С-концевой части отоферлина был обнаружен только в ВВК, тогда как флуоресценция eGFP могла дополнительно быть обнаружена в наружных волосковых клетках (НВК), а также в других типах клеток, которые также не экспрессировали отоферлин. Таким образом, несмотря на то, что AAV трансдуцировали в несколько типов клеток органа Корти, экспрессия отоферлина была ограничена ВВК. Для количественной оценки уровней экспрессии отоферлина измеряли иммунофлуоресценцию с использованием антитела против N-концевого отоферлина в стопках конфокальных изображений иммуноокрашенных ВВК (как в Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Было обнаружено, что в *Otof*^{-/-} ВВК, трансдуцированных двойным AAV, уровни отоферлина составляли ~ 30% от контролей дикого типа.

Поскольку синапсы у *Otof*^{-/-} мышей частично утрачиваются в течение второй

постнатальной недели, был проведен эксперимент, чтобы определить, влияет ли экспрессия отоферлина в этих ВВК на количество синапсов. Синаптические ленты подвергали иммуномечению; $9 \pm 0,3$ синапсов были обнаружены в 26-суточных нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} ВВК (n=42 клетки, N=3 животных). В трансдуцированных двойным AAV *Otof*^{-/-}, по флуоресценции eGFP было идентифицировано $10 \pm 0,2$ синапсов (n=59 клеток; N=3 животных). Напротив, ВВК дикого типа демонстрировали 13-16 синапсов на ВВК (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Таким образом, экспрессия отоферлина после инъекции двойным AAV на P6 частично предотвращала потерю синапсов от P26 *Otof*^{-/-} ВВК.

Данные на Фиг. 15 и 16 также демонстрируют, что гибридный подход (введение векторов, приведенных на Фиг. 2) также восстанавливает активность отоферлина в ВВК *Otof*^{-/-} мышей.

Эти данные демонстрируют, что заявленные в настоящее время способы могут восстанавливать слух у млекопитающих, имеющих инактивирующую мутацию в гене отоферлина.

Пример 17 - Восстановление экзоцитоза в ответ на короткие стимулы деполяризации, вызванное экспрессией отоферлина, опосредованной двойным AAV с транс-сплайсингом, в ВВК *Otof*^{-/-} мышей

Был проведен эксперимент, чтобы определить, восстановят ли заявленные в настоящее время способы слияние синаптических везикул с внутренними слуховыми волосковыми клетками у

Otof^{-/-} мышей.

Поскольку слияние синаптических везикул увеличивает поверхность плазматической мембраны клетки, это слияние можно измерить как увеличение емкости плазматической мембраны (ΔC_m). Для количественной оценки экзоцитоза легко высвобождаемого пула везикул и устойчивого экзоцитоза изменение емкости плазматической мембраны (ΔC_m) измеряли в конфигурации перфорированного пэтч-клампа (Фиг. 8-10). Экзоцитоз регистрировали как изменение емкости мембраны после деполяризации ВВК до -14 мВ в течение указанного периода времени.

ВВК из недавно эксплантированных органов Корти мышей деполяризовали на 14-18-е сутки постнатального развития (P14-P18) до напряжения, при котором вызывались максимальные Ca^{2+} токи, как правило, -14 мВ. Были зарегистрированы Ca^{2+} токи и ΔC_m от *Otof*^{-/-} ВВК с вирусной трансдукцией и без нее, при этом ВВК, трансдуцированные вирусом, идентифицировались по их флуоресценции eGFP во время эксперимента. В соответствии с количеством синапсов в необработанных и трансдуцированных *Otof*^{-/-} ВВК, Ca^{2+} токи были сопоставимы по размеру с таковыми в *Otof*^{+/+} контрольной группе, соответствующей по возрасту и фону (Фиг. 8 и 10). Как показано на Фиг. 8, Ca^{2+} токи не различались по амплитуде или стробирующим свойствам между нетрансдуцированными *Otof*^{-/-} ВВК, ВВК, трансдуцированными двойным AAV, или ВВК дикого типа от сопоставимых по фону контрольных животных. В ответ на импульсы деполяризации длительностью 5 или 10 мс экзоцитоз в трансдуцированных *Otof*^{-/-} ВВК оказался таким же, как и в *Otof*^{+/+} ВВК, в то

время как в нетрансдуцированных *Otof*^{-/-} ВБК изменения в C_m практически не было обнаружено (Фиг. 9). Действительно, для коротких стимулов деполяризации до 20 мс экзоцитоз в трансдуцированных двойным AAV ВБК у *Otof*^{-/-} мышей был подобен экзоцитозу у мышей дикого типа, что указывает на интактный, легко высвобождаемый пул везикул. Во время устойчивой деполяризации везикулы из легко высвобождаемого пула должны пополняться; известно, что для этого процесса требуется отоферлин (Pangrsic et al. (2010) Nat. Neurosci. 13 869-876; Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Для более длительных стимулов деполяризации экзоцитоз находился в диапазоне *Otof*^{I515T/I515T} мышей с нарушением слуха легкой степени (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Как показано на Фиг. 9, для 50-100 мс деполяризации экзоцитоз в трансдуцированных *Otof*^{-/-} ВБК составлял ~ 60% от *Otof*^{+/+} ВБК, в то время как нетрансдуцированные *Otof*^{-/-} ВБК практически не демонстрировали слияния везикул, как описано ранее (Roux et al. (2006) Cell 127 277-289). Скорость пополнения везикул была рассчитана для отдельных трансдуцированных клетках. Было обнаружено, что приблизительно триста восемьдесят везикул/сек/активная зона подвергаются экзоцитозу, по сравнению с 750 везикулами/сек/активная зона в *Otof*^{+/+} ВБК (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Таким образом, в трансдуцированных *Otof*^{-/-} ВБК скорость пополнения везикул в RRP могла быть частично восстановлена и находилась между контролями дикого типа и *Otof*^{I515T/I515T} мышами с нарушениями слуха легкой степени (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Как показано на Фиг. 10, интегралы Ca^{2+} во время стадии деполяризации указывают на то, что аналогичный заряд Ca^{2+} проникает в ВБК в трансдуцированные и нетрансдуцированные *Otof*^{-/-} ВБК и в контрольные клетки дикого типа.

Был выбран серотип 6 AAV, в результате чего частота трансдукции ВБК составила до 51%. Искусственный серотип Anc80L65 может, как недавно было показано (Landegger et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35 280-284), еще больше увеличивать частоту трансдукции ВБК, особенно при применении к более зрелым ушам (Suzuki et al. (2017) Scientific Reports 7 45524).

В итоге эти данные демонстрируют, что слух был восстановлен у девяти *Otof*^{-/-} животных, которым получали инъекцию, с использованием описанных в данном документе способов. Эти данные также демонстрируют, что пороги слышимости тем лучше, чем больше ВБК экспрессируют отоферлин.

Пример 18: Стратегия транс-сплайсинга аденоассоциированного вируса (AAV)

По меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот (например, векторы на основе AAV) могут быть использованы для восстановления активного гена отоферлина (например, гена полноразмерного отоферлина) в клетке после межмолекулярной конкатамеризации и транс-сплайсинга. См., например, Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12; 6716-6721, 2000, включены в данный документ полностью.

В некоторых примерах будут применяться два разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать промотор (например, любой из описанных в данном документе промоторов), первую кодирующую последовательность,

которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' промотора (например, часть любого размера из описанного в данном документе белка отоферлина, и/или любую из N-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), и сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина (т.е. всю часть белка отоферлина, которая не входит в N-концевую часть), расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга (например, часть любого размера из описанного в данном документе белка отоферлина, и/или любую из С-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), и последовательность полиаденилирования на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из описанных в данном документе последовательностей полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 75 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот в длину), аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей не перекрывается с последовательностью другой кодируемой части, и ни один из двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Когда две кодирующие последовательности двух векторов экспрессируются в клетке млекопитающего (например, в любой из клеток млекопитающих, описанных в данном документе), между сигнальной последовательностью донора сплайсинга и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг, тем самым образуя рекомбинированную мРНК, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В другом примере можно использовать три разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать часть последовательности промотора (например, любую из последовательностей промотора, описанных в данном документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из кодирующих отоферлин последовательностей, описанных в данном документе), расположенную на 3' промотора, и первую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, который кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе). Особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (то есть сплайсинг не будет

происходить между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются различными (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты будет содержать вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, который кодирует третью часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце второй сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из последовательностей полиаденилирования, описанных в данном документе). В таких способах, где используются три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе, а вторая последовательность донора сплайсинга и вторая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинировать), а части белка отоферлина, соответственно, кодируемые первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрываются, и при введении в клетку млекопитающего (например, любую из клеток млекопитающих, описанных в данном документе), между первой последовательностью донора сплайсинга и первой последовательностью акцептора сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг с образованием сплайсированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). На основе стратегий, представленных выше, специалист в данной области техники поймет, как разработать стратегию с использованием четырех, пяти или шести различных векторов нуклеиновых кислот.

В любом из примеров этих способов аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей не перекрывается с последовательностью любой из других кодируемых частей, и ни один вектор не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

Каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей может состоять по меньшей мере из 30 аминокислот (например, от около 30 аминокислот до около 1600 аминокислот или любой другой других поддиапазонов

этого диапазона, описанных в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления каждая из кодирующих последовательностей может содержать по меньшей мере один экзон и по меньшей мере один интрон SEQ ID NO: 12 (например, по меньшей мере два экзона и по меньшей мере один интрон, по меньшей мере два экзона и по меньшей мере два интрона, по меньшей мере три экзона и по меньшей мере один интрон, по меньшей мере три экзона и по меньшей мере два интрона или по меньшей мере три экзона, и по меньшей мере три интрона). В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей может кодировать до 80% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60% или до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается. В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей кодирует до 80% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60% или до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается.

Каждый из по меньшей мере двух векторов нуклеиновых кислот может дополнительно содержать инвертированный концевой повтор (ITR) для обеспечения рекомбинации «голова к хвосту». В дальнейшем ITR будет удален путем сплайсинга. Например, ITR может быть палиндромным ITR с двойной D, как описано в Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(12):6716-6721, 2000, полностью включено в данный документ. Например, ITR может быть ITR серотипа 2 AAV, как описано в Mol. Ther. 16:124-130, 2008, и Gosh et al., *Human Gene Ther.* 22: 77-83, 2011. Неограничивающие примеры сигнальных последовательностей акцептора и/или донора сплайсинга в данной области техники. См., например, Reich et al., *Human Gene Ther.* 14(1):37-44, 2003, и Lai et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(11):1435-1439, 2005, 2005. Сигнальные последовательности донора и акцептора сплайсинга могут быть любым сигналом сплайсинга интрона эндогенного гена (например, гена отоферлина).

Например, сигнальная последовательность донора сплайсинга может быть:

5'-GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGA

AACTGGGCTTGTCTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT-3' (SEQ ID NO: 6) , и

сигнал акцептора сплайсинга может быть:

5'-ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTC CACAG-3' (SEQ ID NO: 7) (см, например, Trapani et al., *EMBO Mol. Med.* 6(2):194-211, 2014).

В данной области техники известны способы оценки эффективности сплайсинга и эффективности сплайсинга (см., например, Lai et al., *Nat. Biotechnol.* 23(11): 1435-1439, 2005).

Пример 19: Стратегия транс-сплайсинга гибридного вектора с использованием высокорекомбиногенной области экзогенного гена щелочной фосфатазы (AP)

По меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять или шесть) разных векторов нуклеиновых кислот (например, векторы на основе AAV) также могут быть использованы в любом из описанных в данном документе способов для восстановления активного гена отоферлина (например, гена полноразмерного отоферлина) в клетке после межмолекулярной конкатамеризации, опосредованной маркерным геном рекомбинации, и транс-сплайсинга. Эта стратегия представляет собой гибридную стратегию, поскольку она будет включать гомологичную рекомбинацию и/или транс-сплайсинг. См., например, Gosh et al., *Mol. Ther.* 16: 124-130, 2008; Gosh et al., *Human Gene Ther.* 22: 77-83, 2011; and Duan et al., *Mol. Ther.* 4: 383-391, 2001, каждый из которых полностью включен в данный документ. В данном контексте детектируемый маркерный ген может представлять собой высокорекомбиногенную последовательность ДНК, которая позволяет проводить рекомбинацию, независимую от кодирующей последовательности. Неограничивающим примером детектируемого маркерного гена является ген щелочной фосфатазы (AP). Например, детектируемый маркерный ген может представлять собой среднюю треть комплементарной ДНК плацентарного AP человека, длина которой составляет 872 п.н. (см., например, Gosh et al., 2008). По меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот будут содержать детектируемый маркерный ген (например, любой из детектируемых маркерных генов, описанных в данном документе). Поскольку гибридный вектор будет сконструирован на основе транс-сплайсинг-вектора, как описано в Примере 18, активный ген отоферлина (например, полноразмерный ген отоферлина) может быть восстановлен с использованием ITR-опосредованной рекомбинации и транс-сплайсинга или опосредованной детектируемым маркерным геном (например, опосредованной геном AP) рекомбинации и транс-сплайсинга. После транс-сплайсинга активный ген отоферлина (например, полноразмерный ген отоферлина) будет восстановлен в геномной ДНК клетки млекопитающего (например, любой клетки млекопитающего, описанной в данном документе).

В одном примере будут использоваться два разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать промотор (например, любой из описанных в данном документе промоторов), первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' промотора (например, часть любого размера из описанного в данном документе белка отоферлина, и/или любую из N-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и первый детектируемый маркерный ген, расположенный на 3' сигнальной последовательности донора сплайсинга. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать второй детектируемый маркерный ген, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' второго детектируемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга (например, часть любого размера из описанного в данном документе

белка отоферлина, и/или любую из С-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), и последовательность полиаденилирования на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из описанных в данном документе последовательностей полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 75 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот в длину), аминокислотные последовательности каждой из кодируемых частей не перекрываются, и ни один из двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). При введении в клетку млекопитающего (например, любую из клеток млекопитающих, описанных в данном документе) между сигнальной последовательностью донора сплайсинга и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг, тем самым образуя РНК-кислоту, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В другом примере можно использовать три разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать часть последовательности промотора (например, любую из последовательностей промотора, описанных в данном документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из кодирующих последовательностей отоферлина, описанную в данном документе), расположенную на 3' промотора, первую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и первый детектируемый маркерный ген. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать второй детектируемый маркерный ген, первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' второго детектируемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе), и третий детектируемый маркерный ген. Особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (то есть сплайсинг не будет происходить между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой

кислоты являются различными (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты может содержать четвертый детектируемый маркерный ген, вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' четвертого детектируемого маркерного гена, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует третью часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце второй сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из последовательностей полиаденилирования, описанных в данном документе). В таких способах, где используются три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинировать), а вторая последовательность донора сплайсинга и вторая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинировать), а часть белка отоферлина, кодируемая первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрывается, и при введении в клетку млекопитающего (например, любую из клеток млекопитающих, описанных в данном документе), между первой последовательностью донора сплайсинга и первой последовательностью акцептора сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг с образованием рекомбинированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Как можно понять из уровня техники, когда используются три вектора нуклеиновых кислот, два из по меньшей мере двух разных векторов нуклеиновых кислот могут содержать детектируемый маркерный ген (например, маркерный ген AP) и один из по меньшей мере двух различных векторов нуклеиновых кислот может содержать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности донора сплайсинга в векторе нуклеиновой кислоты, который содержит детектируемый маркерный ген. Например, в некоторых вариантах осуществления первый и второй векторы нуклеиновых кислот могут содержать детектируемый маркерный ген (например, маркерный ген AP), а третий вектор нуклеиновой кислоты будет содержать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности донора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, а третий вектор нуклеиновой кислоты не будет содержать детектируемый маркерный ген (например, маркерный ген AP). В других примерах второй и третий вектор нуклеиновой кислоты могут содержать детектируемый маркерный ген (например, маркерный ген AP), а первый вектор нуклеиновой кислоты будет содержать сигнальную последовательность донора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности акцептора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, а первый вектор нуклеиновой кислоты не будет содержать детектируемый маркерный ген (например, маркерный ген AP).

На основе стратегий, представленных выше, специалист в данной области техники поймет, как разработать стратегию с использованием четырех, пяти или шести векторов.

Кодирующие последовательности, представленные по меньшей мере в двух векторах нуклеиновых кислот (например, двух, трех, четырех, пяти или шести), не будут перекрываться. Каждый из по меньшей мере двух разных векторов может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей состоит, например, из по меньшей мере 30 аминокислот (например, от около 30 аминокислот до около 1600 аминокислот, или любого из других поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует по меньшей мере один экзон и по меньшей мере один интрон из SEQ ID NO: 12 (например, по меньшей мере два экзона и по меньшей мере один интрон, по меньшей мере два экзона и по меньшей мере два интрона, по меньшей мере три экзона, по меньшей мере один интрон, по меньшей мере три экзона и по меньшей мере два интрона, или по меньшей мере три экзона и по меньшей мере три интрона). В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует до 80% SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60%, до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается. В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует до 80% SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60%, или до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается.

Как описано в Примере 18, каждый из по меньшей мере двух векторов нуклеиновых кислот может дополнительно содержать инвертированный концевой повтор (ITR) для обеспечения рекомбинации «голова к хвосту». В дальнейшем ITR будет удален путем сплайсинга. Примеры ITR и сигнальных последовательностей акцептора и/или донора сплайсинга известны в данной области техники и описаны в Примере 18.

Пример 20. Стратегия транс-сплайсинга гибридного вектора с использованием высокорекомбиногенной области экзогенного гена (АК) фага F1

По меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять или шесть) разных векторов нуклеиновых кислот (например, векторы на основе AAV) также могут быть использованы в любом из описанных в данном документе способов для восстановления активного гена отоферлина (например, гена полноразмерного отоферлина) в клетке после межмолекулярной конкатамеризации, опосредованной маркерным геном рекомбинации, и транс-сплайсинга. См., например, векторы, приведенные на Фиг. 2. Эта стратегия представляет собой гибридную стратегию, поскольку она будет включать гомологичную

рекомбинацию и/или транс-сплайсинг. См., например, Tapani et al., *EMBO Mol. Med.* 6(2):194-211, 2014, включенный в данный документ полностью. Как используется в данном документе рекомбиногенная область (АК) фага F1 будет использоваться для обеспечения возможности рекомбинации, независимой от кодирующей последовательности. Рекомбиногенная область фага F1 может представлять собой 77 п.н. рекомбиногенную область из генома фага F1, как описано в Tapani et al. (2014) *EMBO Mol. Med.* 6(2):194-211, 2014. По меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот будут содержать рекомбиногенную область фага F1. Поскольку гибридный вектор будет сконструирован на основе транс-сплайсинг-вектора, как описано в Примере 18, нуклеиновая кислота, кодирующая активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок стереоцилин), может быть получена с использованием или ITR-опосредованной рекомбинации и транс-сплайсинга или индуцированной рекомбиногенной областью фага F1 рекомбинации и транс-сплайсинга. После транс-сплайсинга в клетке млекопитающего (например, любой из клеток млекопитающих, описанных в данном документе) образуется нуклеиновая кислота, кодирующая активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В одном примере будут использоваться два разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать промотор (например, любой из описанных в данном документе промоторов), первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' промотора (например, часть любого размера из описанного в данном документе белка отоферлина, и/или любую из N-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и рекомбиногенную область фага F1, расположенную на 3' сигнальной последовательности донора сплайсинга. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать рекомбиногенную область фага F1, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' рекомбиногенной области фага F1, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга (например, часть любого размера из описанного в данном документе белка отоферлина, и/или любую из С-концевых частей описанного в данном документе белка отоферлина), и последовательность полиаденилирования на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из описанных в данном документе последовательностей полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 75 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот в длину), аминокислотные последовательности каждой из кодируемых частей не перекрываются, и ни один из двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). При введении векторов в клетку млекопитающего (например, любую из клеток млекопитающих, описанных в данном документе) между сигнальной последовательностью донора

сплайсинга и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В другом примере будут использоваться три разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может содержать часть последовательности промотора (например, любую из последовательностей промотора, описанных в данном документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из кодирующих последовательностей отоферлина, описанную в данном документе), расположенную на 5' промотора, первую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и рекомбиногенную область фага F1. Второй вектор нуклеиновой кислоты может содержать рекомбиногенную область фага F1, первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' рекомбиногенной области фага F1, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе), и рекомбиногенную область фага F1. Особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (то есть сплайсинг не будет происходить между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются различными (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в данном документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты может содержать рекомбиногенную область фага F1, вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' рекомбиногенной области фага F1, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует третью часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из последовательностей полиаденилирования, описанных в данном документе). В таких способах, где используются три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая

последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинировать), а вторая последовательность донора сплайсинга и вторая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинировать), а часть белка отоферлина, кодируемая первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрывается, и при введении в клетку млекопитающего (например, любую из клеток млекопитающих, описанных в данном документе), между первой последовательностью донора сплайсинга и первой последовательностью акцептора сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга происходит сплайсинг с образованием рекомбинированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Как можно понять из уровня техники, когда используются три вектора нуклеиновых кислот, два из разных векторов нуклеиновых кислот могут содержать рекомбиногенную область фага F1, и один из разных векторов нуклеиновых кислот может содержать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности донора сплайсинга в векторе нуклеиновой кислоты, который содержит рекомбиногенную область фага F1. Например, в некоторых вариантах осуществления первый и второй векторы нуклеиновых кислот могут содержать рекомбиногенную область фага F1, а третий вектор нуклеиновой кислоты будет содержать сигнал акцептора сплайсинга, который комплементарен сигнальной последовательности донора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и третий вектор нуклеиновой кислоты не будет содержать рекомбиногенную область фага F1 (например, маркерный ген AP). В других примерах второй и третий вектор нуклеиновой кислоты могут содержать рекомбиногенную область фага F1, а первый вектор нуклеиновой кислоты будет содержать сигнальную последовательность донора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности акцептора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и первый вектор нуклеиновой кислоты не будет содержать рекомбиногенную область фага F1. На основе стратегий, представленных выше, специалист в данной области техники поймет, как разработать стратегию с использованием четырех, пяти или шести векторов.

Кодирующие последовательности, представленные в каждом из по меньшей мере двух векторов нуклеиновых кислот (например, двух, трех, четырех, пяти или шести), не будут перекрываться. Каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей состоит из по меньшей мере 30 аминокислот (например, от около 30 до около 1600 аминокислот, или любого из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует по меньшей мере один экзон и по меньшей мере один интрон из SEQ ID NO: 12 (например, по меньшей мере два

экзона и по меньшей мере один интрон, по меньшей мере два экзона и по меньшей мере два интрона, по меньшей мере три экзона, по меньшей мере один интрон, по меньшей мере три экзона и по меньшей мере два интрона, или по меньшей мере три экзона и по меньшей мере три интрона). В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует до 80% SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60%, или до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается. В некоторых вариантах осуществления каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, причем каждая из кодируемых частей кодирует до 80% SEQ ID NO: 5 (например, до 10%, до 20%, до 30%, до 40%, до 50%, до 60%, или до 70% SEQ ID NO: 5), так что каждая из кодируемых частей не перекрывается.

Как описано в Примере 18 каждый из по меньшей мере двух векторов нуклеиновых кислот может дополнительно содержать инвертированный концевой повтор (ITR) для обеспечения рекомбинации «голова к хвосту». В дальнейшем ITR будет удален путем сплайсинга. Примеры ITR и сигналов акцептора и/или донора сплайсинга известны в данной области техники и описаны в Примере 18.

Эти способы были использованы для улучшения слуха у пяти животных. Данные на Фиг. 15 и 16 демонстрируют, что *Otof*^{-/-} мыши, которым вводили векторы, приведенные на Фиг. 2, восстанавливают функцию отоферлина в ВВК *Otof*^{-/-} мышей.

Пример 21. Экспрессия полноразмерного отоферлина человека *in vitro* с использованием двух векторов

Было создано множество различных векторов, каждый из которых содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую часть отоферлина: p109 (SEQ ID NO: 84), которая показана на Фиг. 38; p105 (SEQ ID NO: 85), которая показана на Фиг. 39; 105.WPRE, которая показана на Фиг. 40; p108, которая показана на Фиг. 41; 1OTOF18.CL1, которая показана на Фиг. 42; 19OTOF48, которая показана на Фиг. 43; 1OTOF20.CL1, которая показана на Фиг. 44; 21OTOF48.WPRE, которая показана на Фиг. 45; 1OTOF21.CL1, которая показана на Фиг. 46; и 22OTOF48.WPRE, которая показана на Фиг. 47; 105.pA.NTF3.CMVd, которая показана на Фиг. 48.

Пары этих векторов использовали для трансфекции клеток HEK293FT. В этих экспериментах $1,2 \times 10^5$ клеток/лунку высевали в 24-луночный планшет в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. На следующий день пары линейаризованных ITR-содержащих плазмид (пары показаны на Фиг. 49) трансфицировали в клетки HEK293FT с использованием реактива JetPrime (Polyplus). Через семьдесят два часа после трансфекции клетки собирали и лизировали с использованием буфера RIPA и анализировали в 4-12% геле для белка Bolt. Гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану и подвергали блоттингу поликлональным антителом против ОТОФ (Thermo PA5-52935). Моноклональное антитело против бета-актина человека использовали в качестве первичного антитела для внутреннего

контроля для нанесения между дорожками. Были проведены три независимых эксперимента *in vitro* для анализа и сравнения экспрессии полноразмерного белка с использованием различных стратегий рекомбинации относительно трансфекции отдельной плазмиды CMV.fl-OTOF (дорожка 10).

По сравнению с отрицательным контролем экспрессия полноразмерного белка отоферлина (приблизительно 226 кДа) наблюдалась на каждой дорожке, кроме дорожки номер 6 (Фиг. 50 и 51).

Пример 22. Восстановление слуха *in vivo* у OTOF^{-/-} мышей с использованием двух векторов

Был проведен ряд экспериментов, чтобы определить, можно ли восстановить функцию слуха у Otof^{-/-} мышей, которым в их улитку введены два вектора (p109 и p105; SEQ ID NO: 84 и 85, соответственно). Вкратце, вирусный препарат (например, $1-2 \times 10^{10}$ мкг/мкл) вводили через слуховую буллу, покрывающую мембрану круглого окна (МКО), в барабанную лестницу левой улитки примерно на 6-7 сутки после рождения (P6-7). С, Jung et al. (2015) *EMBO J* 34: 2686-2702, и Al-Moyed et al. (2019) *EMBO Molecular Medicine* 11(1). pii: e9396. Перед инъекцией всех мышей подвергали анестезии изофлураном и подвергали местной анестезии, например, с помощью ксилокаинового спрея, перед ретроаурикулярным разрезом.

Акустические стволовые вызванные потенциалы (АСВП) регистрировали у мышей, находящихся под наркозом в возрасте примерно 3-4 недель, подвергшихся тональной послылке частотой 4, 6, 8, 12, 16, 24 или 32 кГц (например, 10 мс плато, 1 мс $\cos^2$ нарастания/спадания или звуковые стимулы в виде широкополосных щелчков в 0,03 мс, предъявляемые с частотой 20 Гц. См., например, Jing et al. (2013) *J Neurosci* 33: 4456-4467. Уши, в которые была введена инъекция, были заполнены электродным гелем, в то время как АСВП регистрировали для контралатеральных неинъектированных ушей.

Пороговые значения щелчка для АСВП были определены как самые низкие уровни звукового давления, необходимые для вызова воспроизводимого волнового ответа АСВП, и были измерены с шагом в 10 децибел (дБ УЗД) от 30 дБ УЗД до 100 дБ УЗД. Пороговые значения тональной послылки регистрировали с шагом 10 дБ УЗД от 10 дБ УЗД ниже самого низкого воспроизводимого АСВП и до 90 дБ УЗД. Волна I АСВП была определена как первый различимый пик между суммационным рецепторным потенциалом (СП) и заметным пиком волны II АСВП. Амплитуду каждой волны АСВП рассчитывали как разницу между высшей точкой волны и последующим локальным минимумом. Суммарная амплитуда I-V волн АСВП была рассчитана путем сложения отдельных значений амплитуды I-V волн АСВП.

Пороговое значение АСВП на щелчки и порог АСВП на тональную послылку определяли у мышей дикого типа, которые не получали лечения, у Otof^{-/-} мышей, которые не получали лечения, и у Otof^{-/-} мышей, которых получали лечение двумя векторами (p109 и p105). Функцию слуха проверяли у получавших лечение Otof^{-/-} на 26-28-е сутки и 91-е сутки после введения. Данные демонстрируют, что Otof^{-/-} мыши продемонстрировали

значительное улучшение функции слуха после лечения двумя векторами по сравнению с Otof^{-/-} мышами, которые не получали лечение, (Фиг. 51 и 52).

Пример 23. Восстановление слуха *in vivo* у людей с использованием двух векторов

Проводят ряд экспериментов, чтобы определить, можно ли восстановить функцию слуха у людей, у которых в улитку введены два вектора (p109 и p105; SEQ ID NO: 84 и 85, соответственно). Функцию слуха проверяют у человека на 15-е, 30-е, 45-е, 60-е и 90-е сутки после введения и сравнивают с функциональным слухом человека, который не получал лечения.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что используемые слова являются словами описания, а не ограничения, и что изменения могут быть сделаны в рамках прилагаемой формулы изобретения без отступления от истинного объема и сущности изобретения в его более широких аспектах.

Хотя данное изобретение было описано довольно подробно и с некоторыми особенностями в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими подробностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но его следует толковать со ссылками на прилагаемую формулу изобретения, чтобы обеспечить максимально широкую интерпретацию такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем изобретения.

Следует понимать, что, хотя изобретение описано в связи с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, заголовки разделов, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не несут ограничительного характера.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, причем:

каждый из по меньшей мере двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует отличную часть белка отоферлина, при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, при этом аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей;

ни один вектор из по меньшей мере двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин;

по меньшей мере одна из кодирующих последовательностей содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами; и

при введении в клетку млекопитающего по меньшей мере два разных вектора подвергаются конкатамеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому или вирусный вектор.

3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой искусственную хромосому человека (НАС - англ.: human artificial chromosome), искусственную хромосому дрожжей (YAC - англ.: yeast artificial chromosome), искусственную бактериальную хромосому (BAC - англ.: bacterial artificial chromosome) или искусственную хромосому на основе P1 (PAC - англ.: P1-derived artificial chromosome).

4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой вирусный вектор, выбранный из аденоассоциированного вирусного (AAV - англ.: adeno-associated virus) вектора, аденовирусного вектора, лентивирусного вектора или ретровирусного вектора.

5. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух разных векторов представляет собой AAV-вектор.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что аминокислотная последовательность одной из кодируемых частей перекрывается с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей.

7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей частично перекрывается с аминокислотной последовательностью другой кодируемой части.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от около 30 аминокислотных остатков до около 1000 аминокислотных остатков.

9. Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что векторы включают два разных вектора, каждый из которых содержит отличный сегмент интрона, причем интрон содержит нуклеотидную последовательность интрона, которая присутствует в геномной ДНК отоферлина, и при этом два разных сегмента перекрываются в последовательности на по меньшей мере 100 нуклеотидов.

10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что два разных сегмента перекрываются в последовательности на от около 100 нуклеотидов до около 800 нуклеотидов.

11. Композиция по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере двух разных векторов имеет длину от около 500 нуклеотидов до около 10000 нуклеотидов.

12. Композиция по п. 11, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере двух разных векторов имеет длину от 500 нуклеотидов до 5000 нуклеотидов.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что количество разных векторов в композиции равно двум.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что первый из двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что N-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 30 аминокислот до 1600 аминокислот.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что N-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 200 аминокислот до 1500 аминокислот.

17. Композиция по любому из пп. 14-16, отличающаяся тем, что первый вектор дополнительно содержит промотор и/или последовательность Козак.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что первый вектор содержит промотор, который представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор или тканеспецифический промотор.

19. Композиция по любому из пп. 14-18, отличающаяся тем, что первый вектор дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен, причем дестабилизирующий домен расположен в 3' положении относительно кодирующей последовательности, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина.

20. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, содержит экзоны 1-21 изоформы 5 гена отоферлина человека.

21. Композиция по любому из пп. 14-20, отличающаяся тем, что второй из двух разных векторов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует C-

концевую часть белка отоферлина.

22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что С-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 30 аминокислот до 1600 аминокислот.

23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что С-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 200 аминокислот до 1500 аминокислот.

24. Композиция по любому из пп. 21-23, отличающаяся тем, что второй вектор дополнительно содержит поли(dA)-последовательность.

25. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, содержит экзоны 22-47 изоформы 5 гена отоферлина человека.

26. Композиция по любому из пп. 1-25, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

27. Набор, содержащий композицию по любому из пп. 1-26.

28. Набор по п. 27, дополнительно содержащий предварительно заполненный шприц, содержащий композицию.

29. Способ, включающий:

введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-26.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

31. Способ по п. 29 или п. 30, отличающийся тем, что млекопитающее было ранее идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

32. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, включающий введение композиции по любому из пп. 1-26 в клетку млекопитающего.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку.

34. Способ по п. 32 или 33, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

35. Способ по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что клетка млекопитающего была ранее определена как имеющая дефектный ген отоферлина.

36. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, включающий:

введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-26.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что млекопитающее было ранее идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

38. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

39. Способ лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта,

идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, включающий:

введение терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-26 в улитку субъекта.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

41. Способ по п. 39 или п. 40, дополнительно включающий, до стадии введения, определение того, что субъект имеет дефектный ген отоферлина.

42. Композиция, содержащая два разных вектора нуклеиновых кислот, причем:

первый вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновых кислот содержит промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3' положении относительно промотора, и сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности; и

второй вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновых кислот содержит сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования на 3'-конце второй кодирующей последовательности;

при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются, при этом ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для образования РНК-транскриптов, между сигнальной последовательностью донора сплайсинга на одном транскрипте и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг, с образованием, таким образом, рекомбинированной молекулы РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин.

43. Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами.

44. Композиция, содержащая:

первый вектор нуклеиновой кислоты, содержащий промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3' положении относительно промотора, сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и первый детектируемый маркерный ген, расположенный в 3' положении относительно сигнальной последовательности донора сплайсинга; и

второй вектор нуклеиновой кислоты, отличный от первого вектора нуклеиновой кислоты, содержащий второй детектируемый маркерный ген, сигнальную

последовательность акцептора сплайсинга, расположенную в 3' положении относительно второго детектируемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности;

при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем соответствующие аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются друг с другом, при этом ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для образования РНК-транскриптов, между сигналом донора сплайсинга на одном транскрипте и сигналом акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг с образованием, таким образом, рекомбинированной молекулы РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин.

45. Композиция по п. 44, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами.

46. Композиция по п. 44, отличающаяся тем, что первый или второй детектируемый маркерный ген кодирует щелочную фосфатазу.

47. Композиция по п. 44 или п. 46, отличающаяся тем, что первый и второй детектируемые маркерные гены являются одинаковыми.

48. Композиция, содержащая:

первый вектор нуклеиновой кислоты, содержащий промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3' положении относительно промотора, сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3'-конце первой кодирующей последовательности, и рекомбиногенную область фага F1, расположенную в 3' положении относительно сигнальной последовательности донора сплайсинга; и

второй вектор нуклеиновой кислоты, отличный от первого вектора нуклеиновой кислоты, содержащий вторую рекомбиногенную область фага F1, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную в 3' положении относительно рекомбиногенной области второго фага F1, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3'-конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3'-конце второй кодирующей последовательности;

при этом каждая из кодируемых частей имеет длину по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, причем соответствующие аминокислотные последовательности

кодируемых частей не перекрываются друг с другом, при этом ни один из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего для образования РНК-транскриптов, между сигналом донора сплайсинга на одном транскрипте и сигналом акцептора сплайсинга на другом транскрипте происходит сплайсинг с образованием, таким образом, рекомбинированной молекулы РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин.

49. Композиция по п. 48, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность по меньшей мере одного из векторов содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами.

50. Набор, содержащий композицию по любому из пп. 42-49.

51. Набор по п. 50, отличающийся тем, что композиция предварительно набрана в шприц.

52. Способ, включающий введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 42-49.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

54. Способ по п. 52 или п. 53, отличающийся тем, что млекопитающее было ранее идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

55. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, включающий введение композиции по любому из пп. 42-49 в клетку млекопитающего.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки.

57. Способ по п. 55 или п. 56, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

58. Способ по любому из пп. 55-57, отличающийся тем, что клетка млекопитающего была ранее определена как имеющая дефектный ген отоферлина.

59. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, включающий введение в улитку терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 39-46.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что млекопитающее было ранее идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

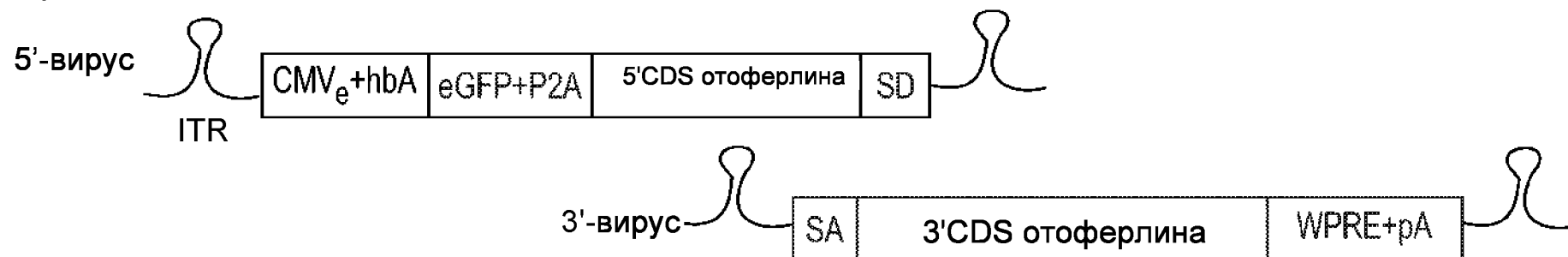
61. Способ по п. 59 или п. 60, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

62. Способ лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, идентифицированного как имеющего дефектный ген отоферлина, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 42-49 в улитку субъекта.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.
64. Способ по п. 62 или п. 63, дополнительно включающий, до стадии введения, определение того, что субъект имеет дефектный ген отоферлина.
65. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 39, а второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 40.
66. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 41, а второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 42.
67. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 84, а второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 85.
68. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что один из по меньшей мере двух разных векторов содержит последовательность, кодирующую белок NTF3.
69. Композиция по п. 68, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок NTF3, по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 78.

По доверенности

Транс-сплайсинг



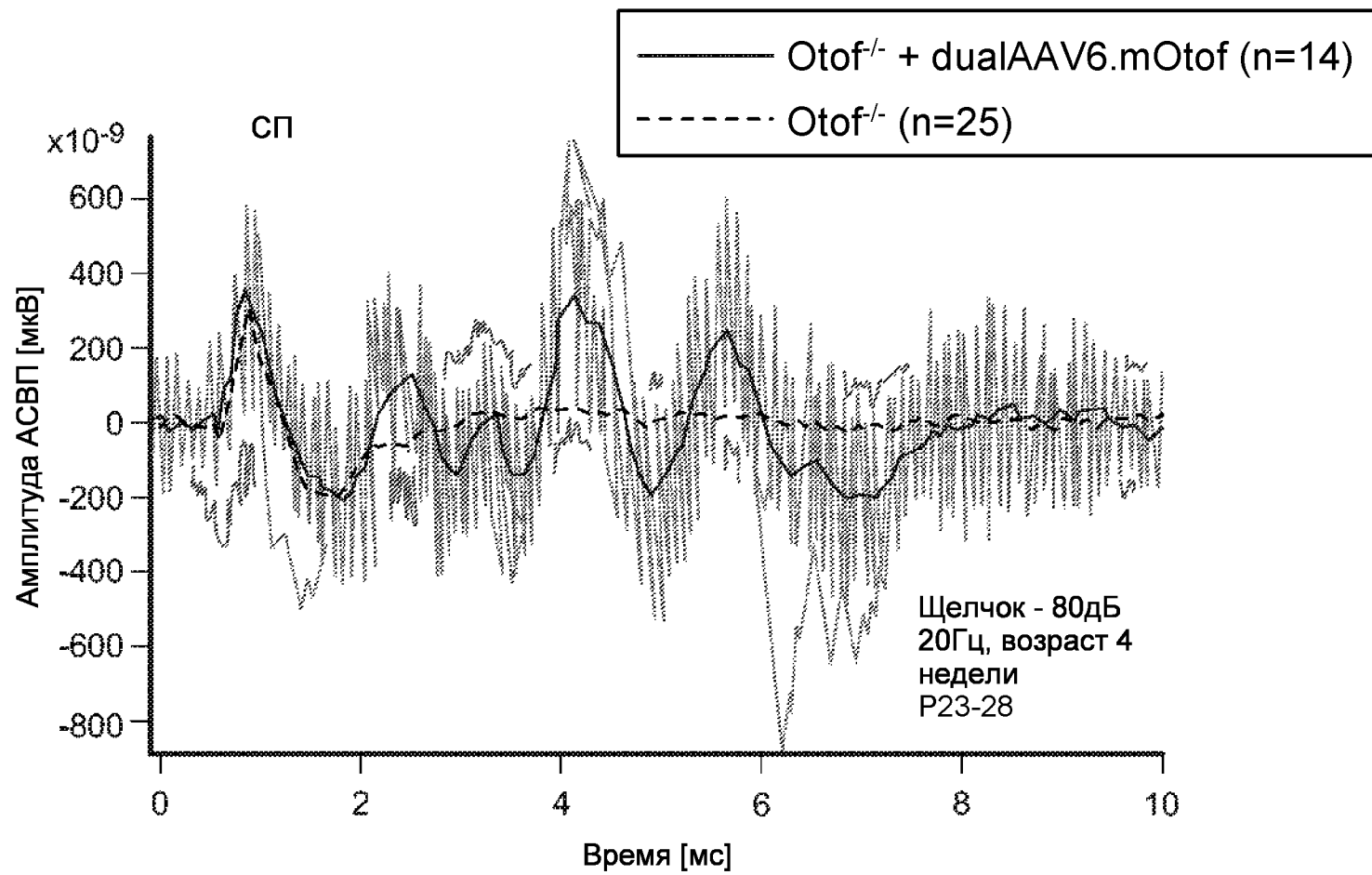
Фиг. 1

1/43

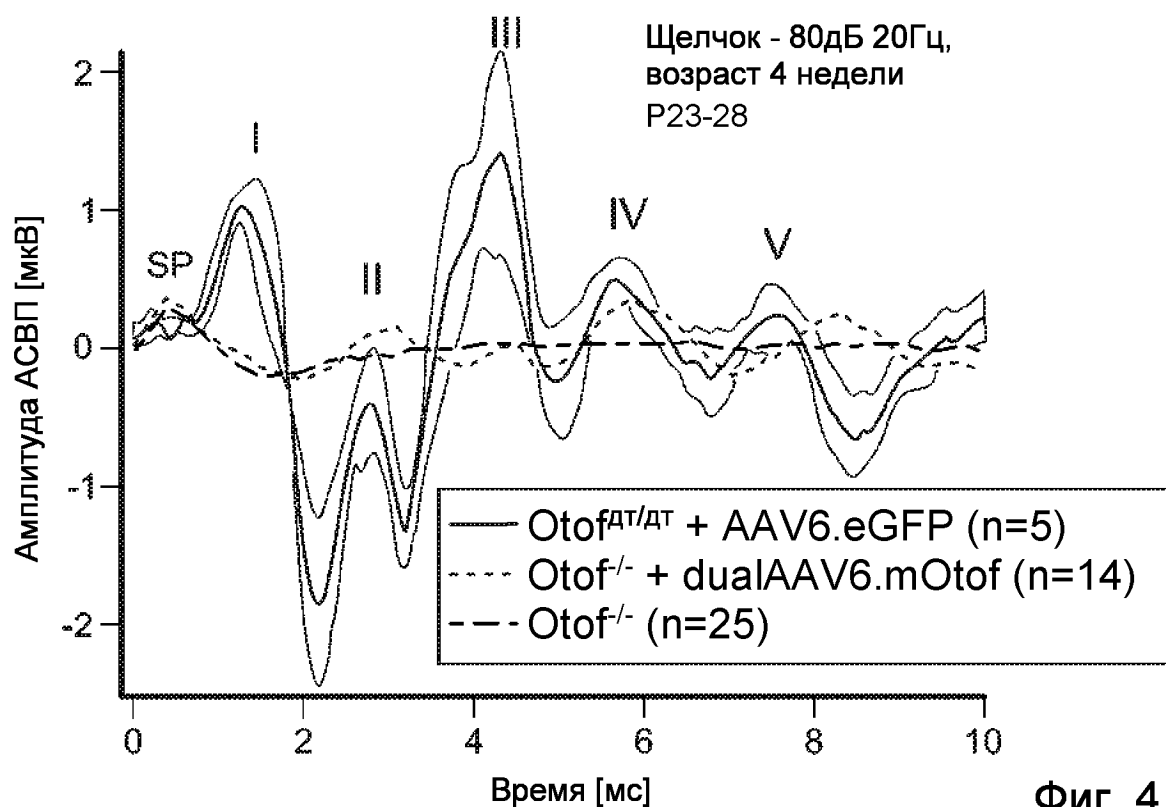
Гибрид



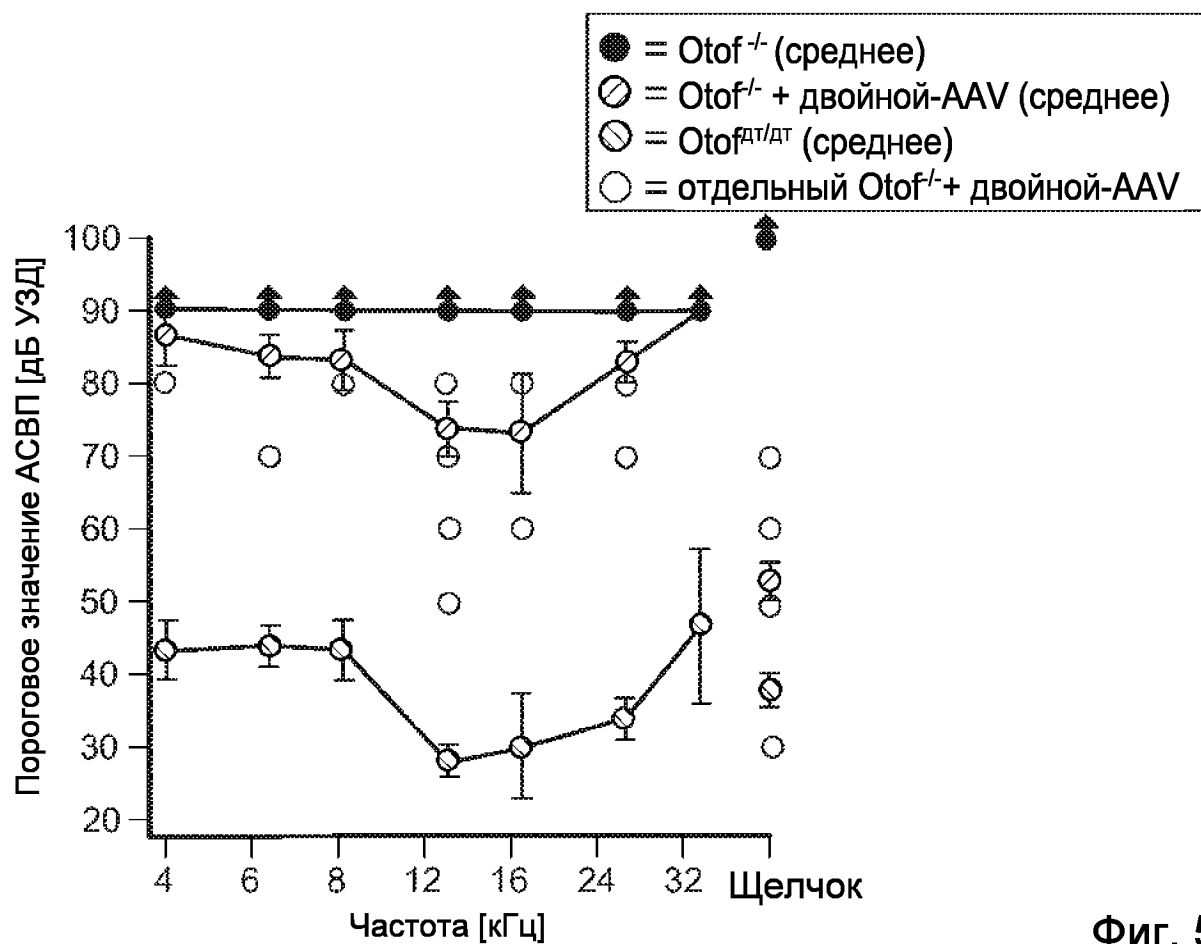
Фиг. 2



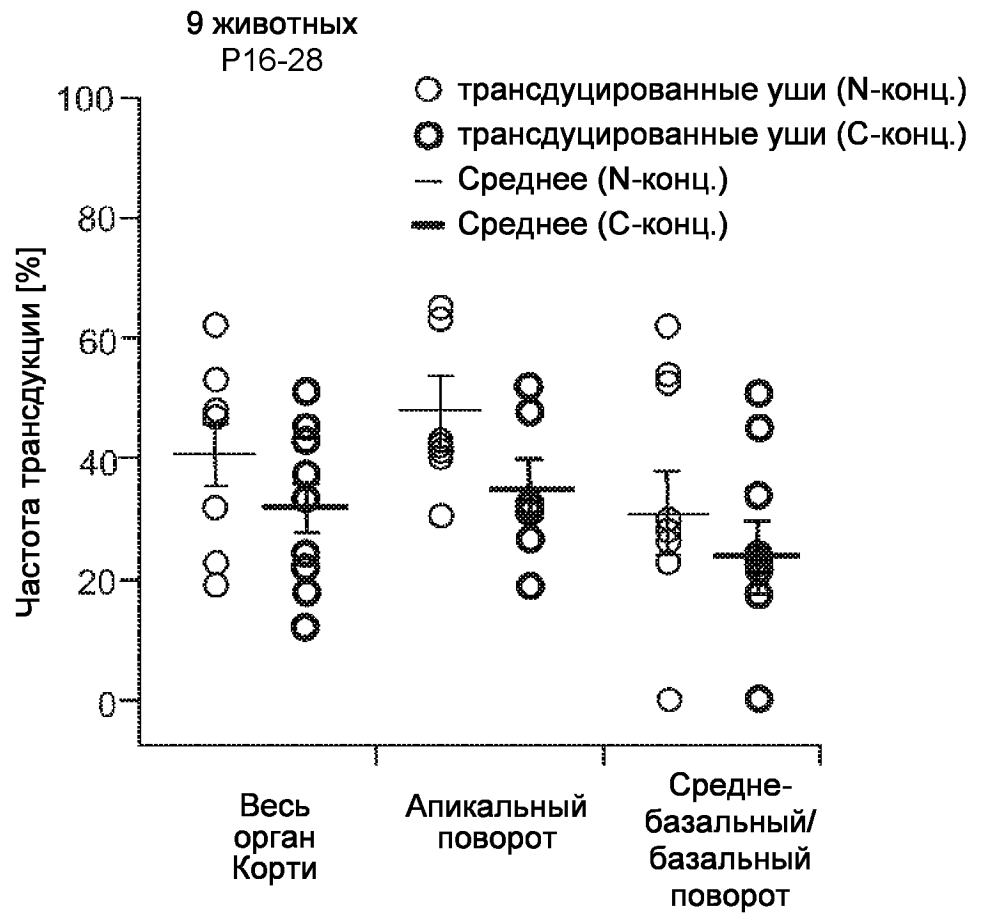
Фиг. 3



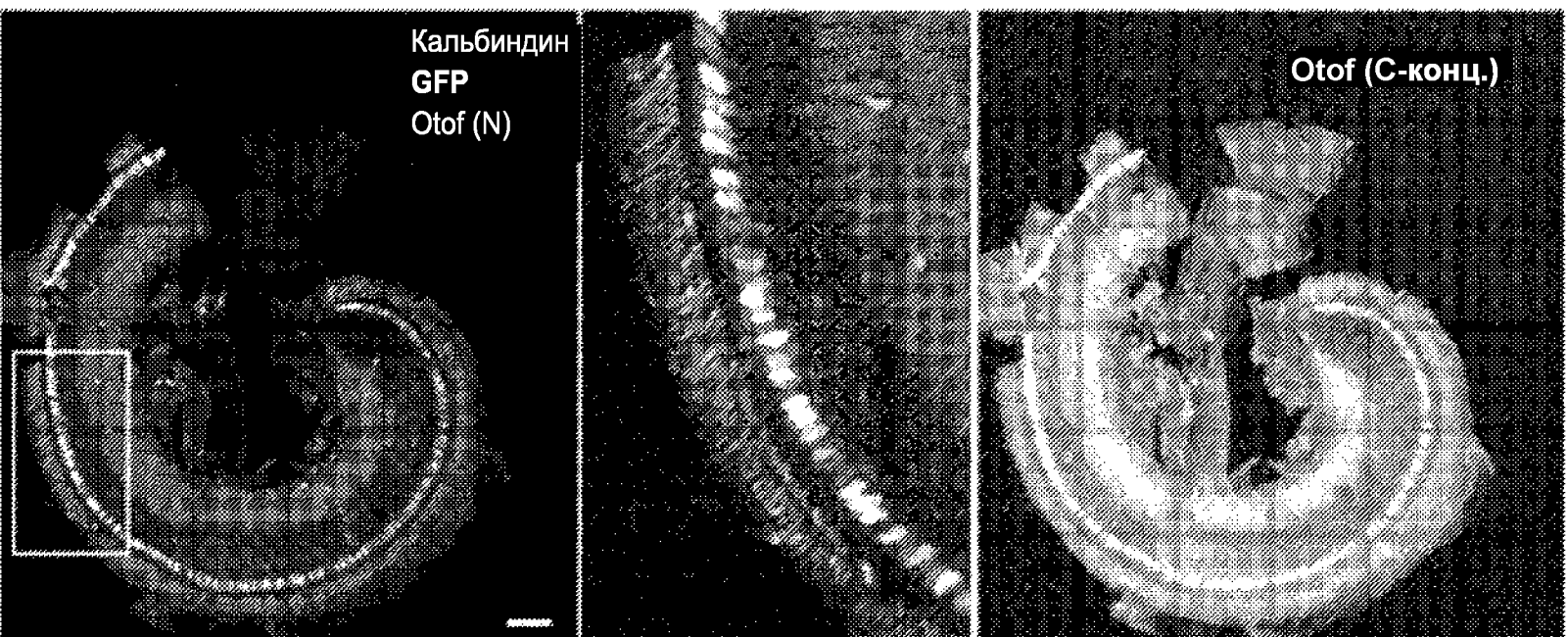
Фиг. 4



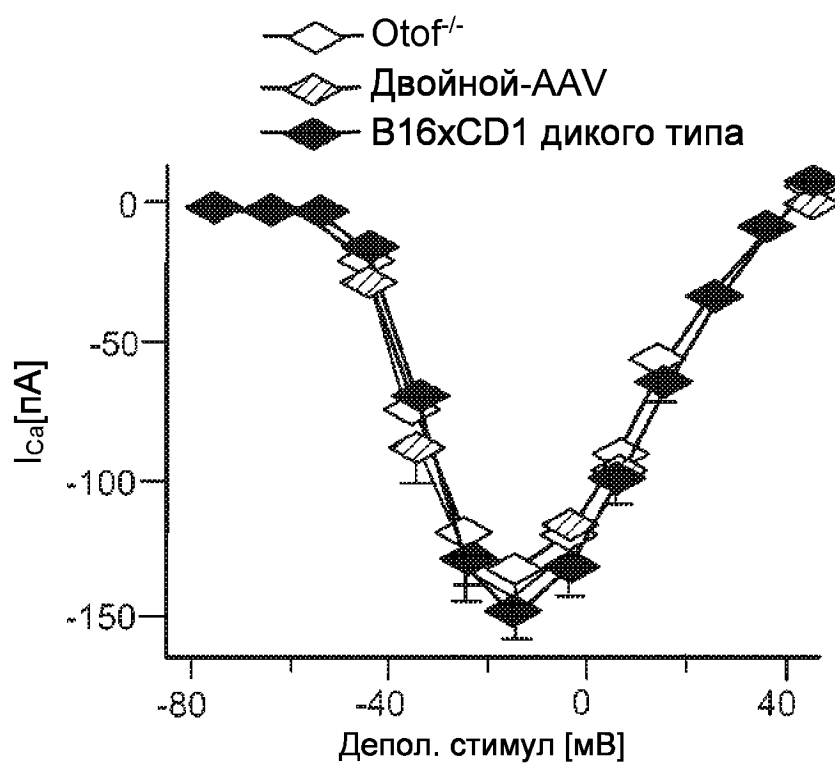
Фиг. 5



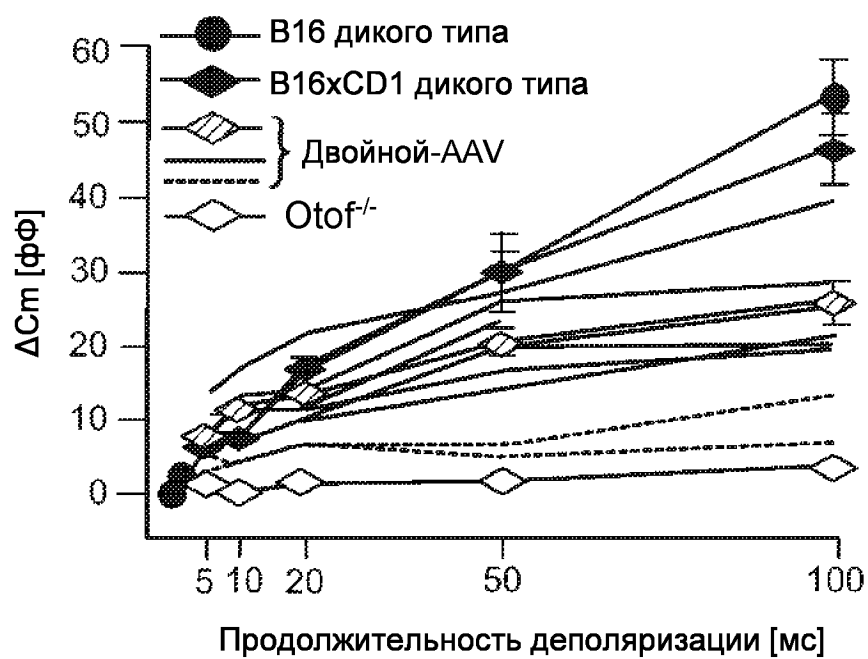
Фиг. 6



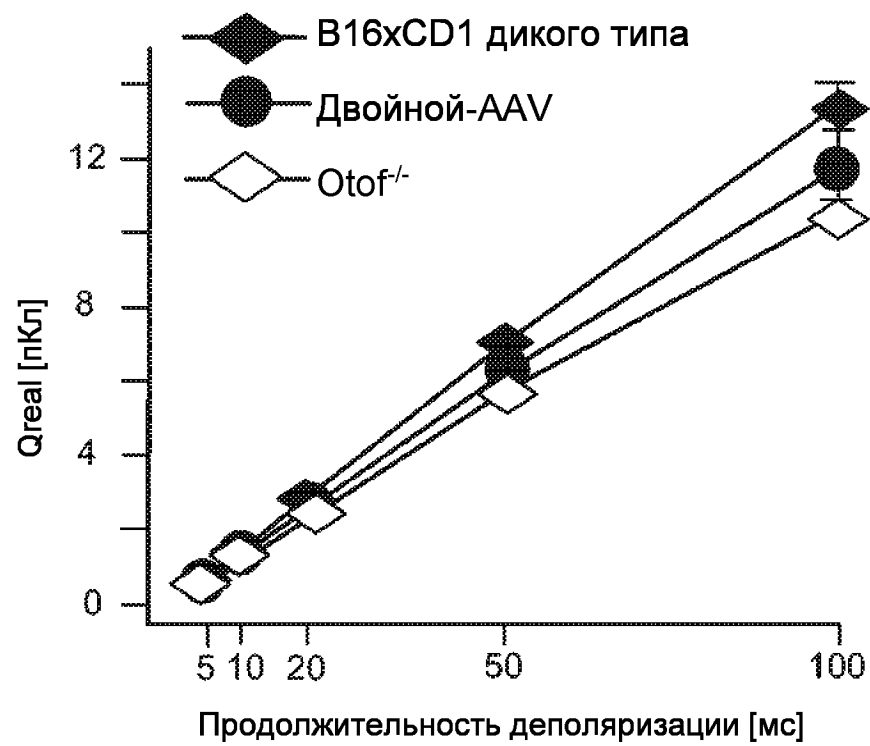
Фиг. 7



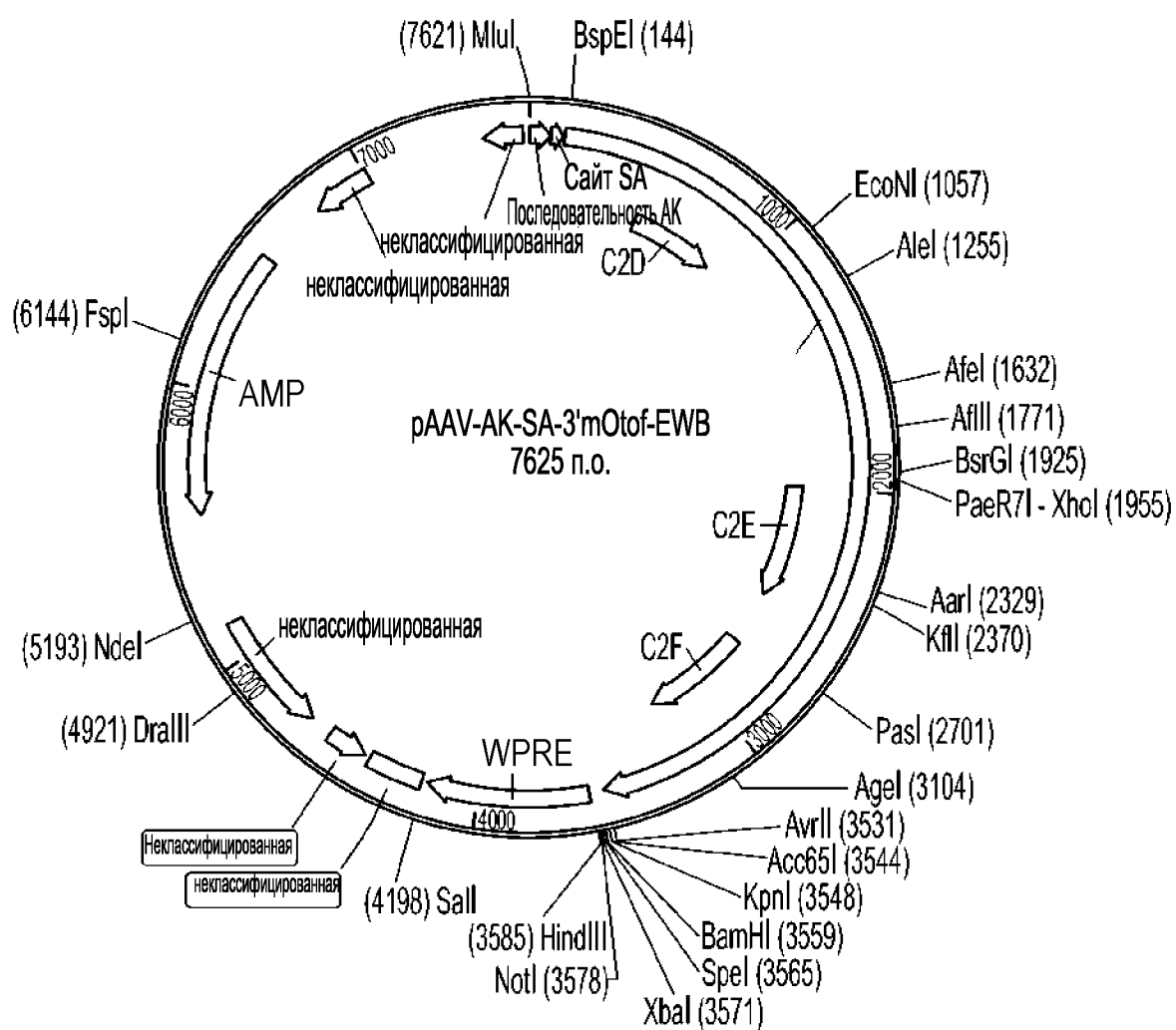
Фиг. 8



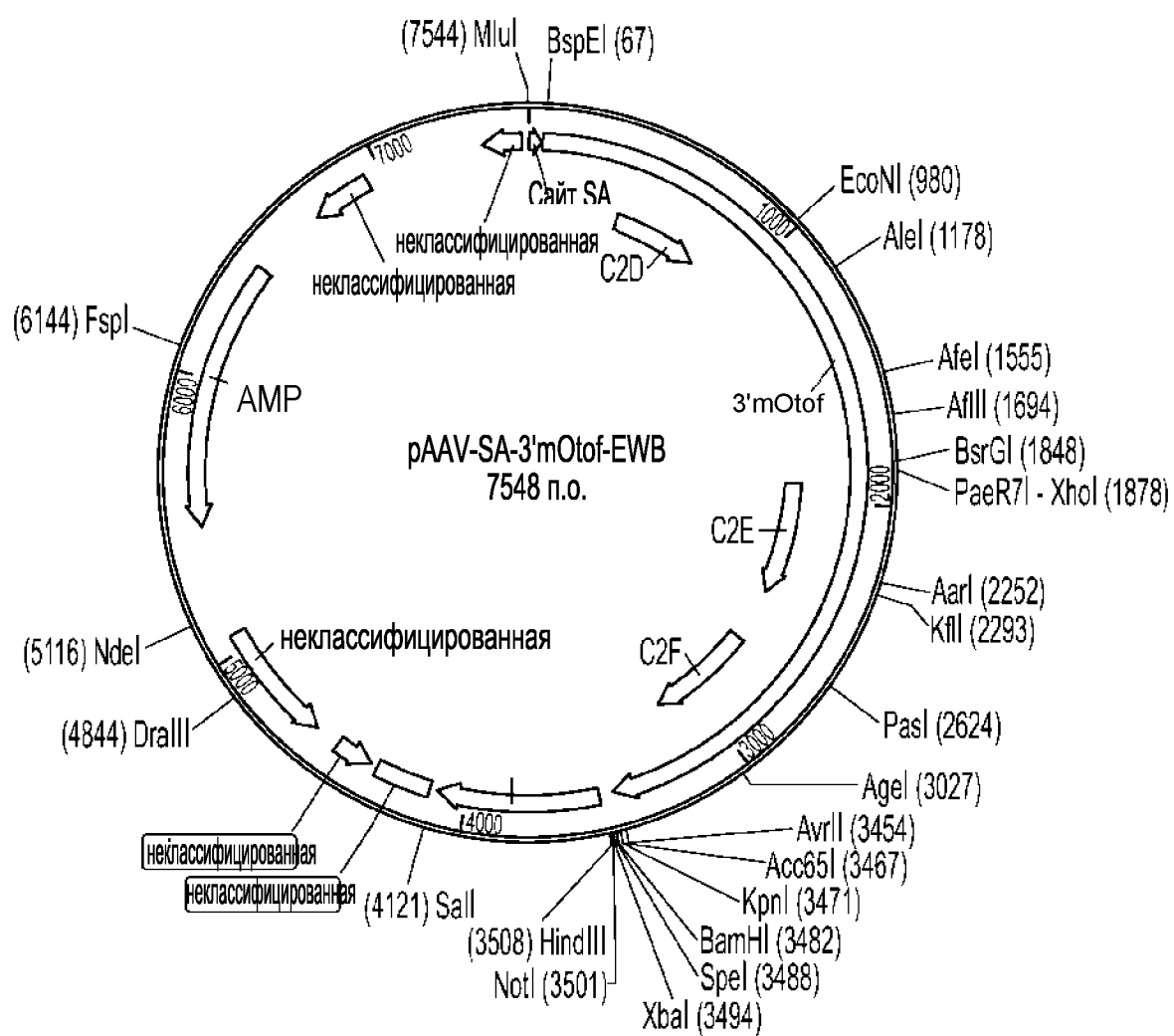
Фиг. 9



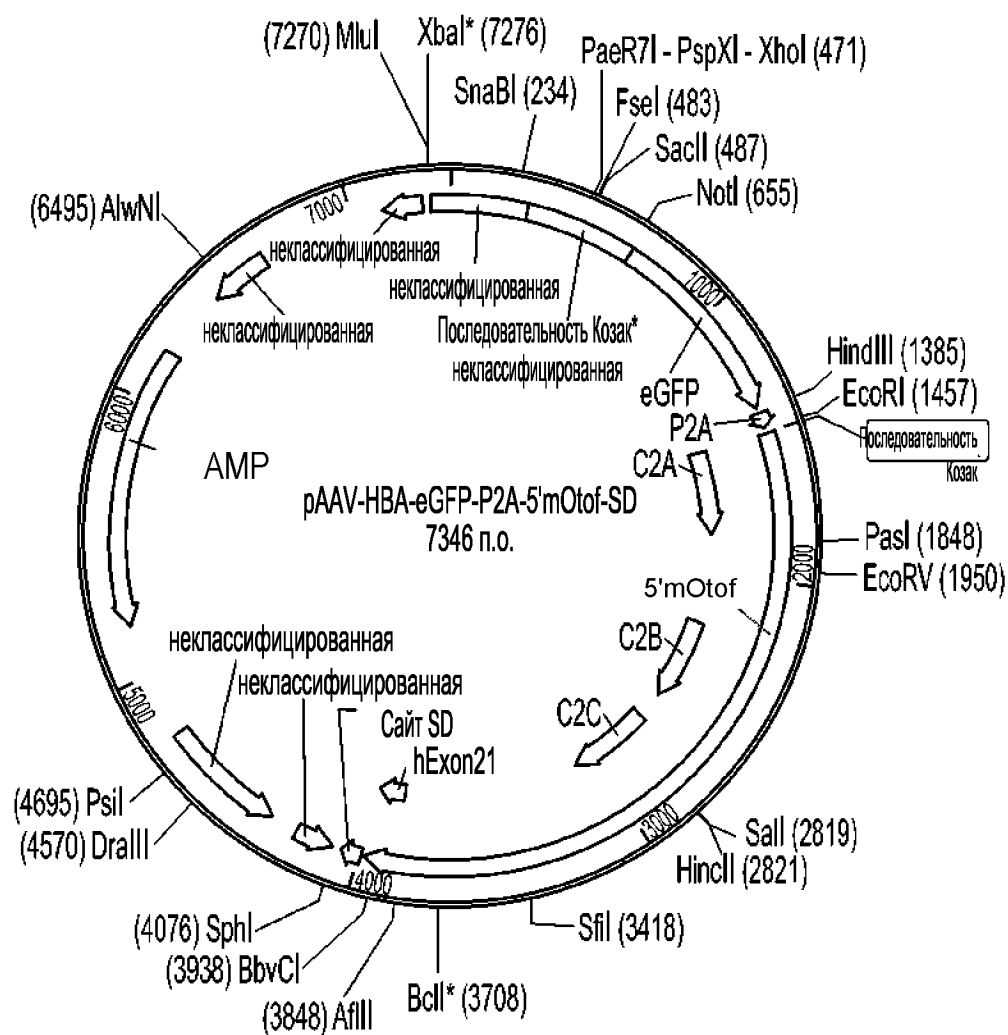
Фиг. 10



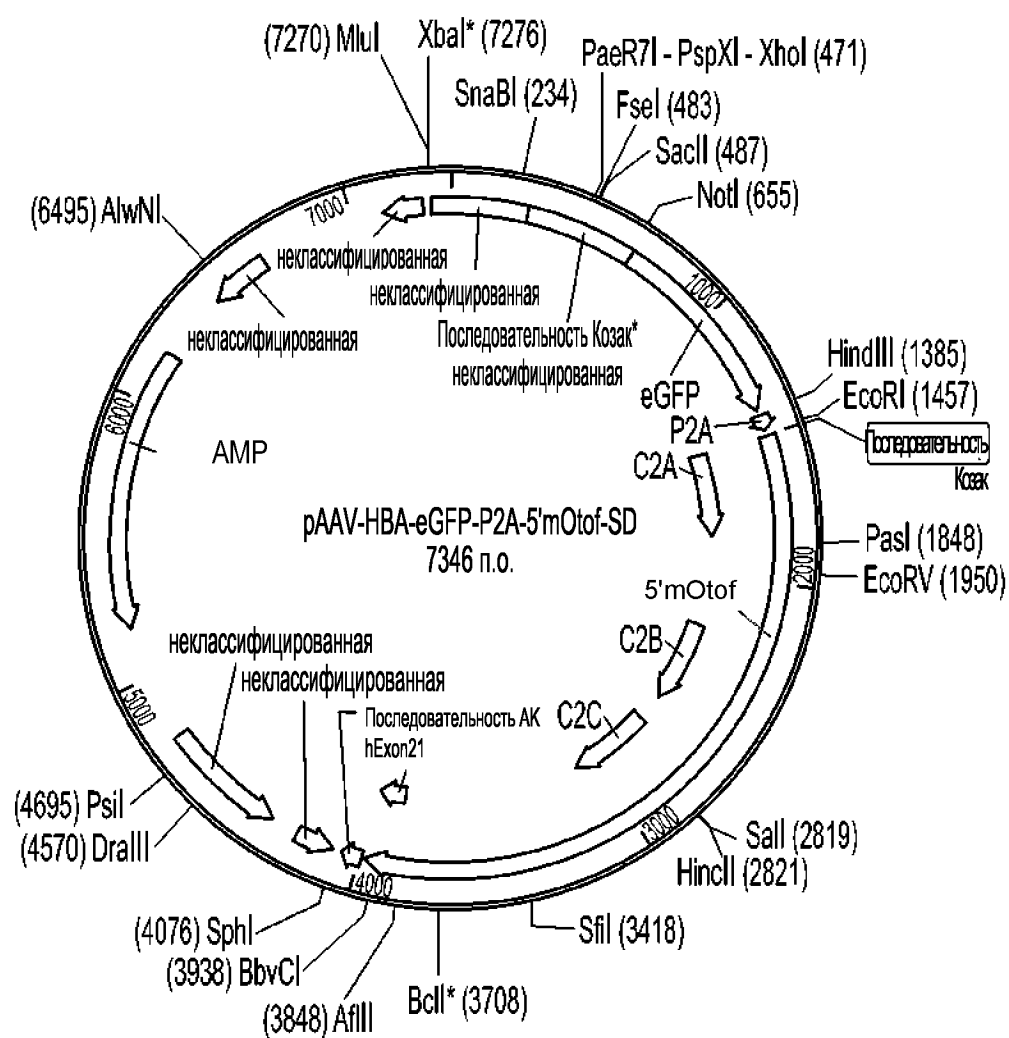
Фиг. 11



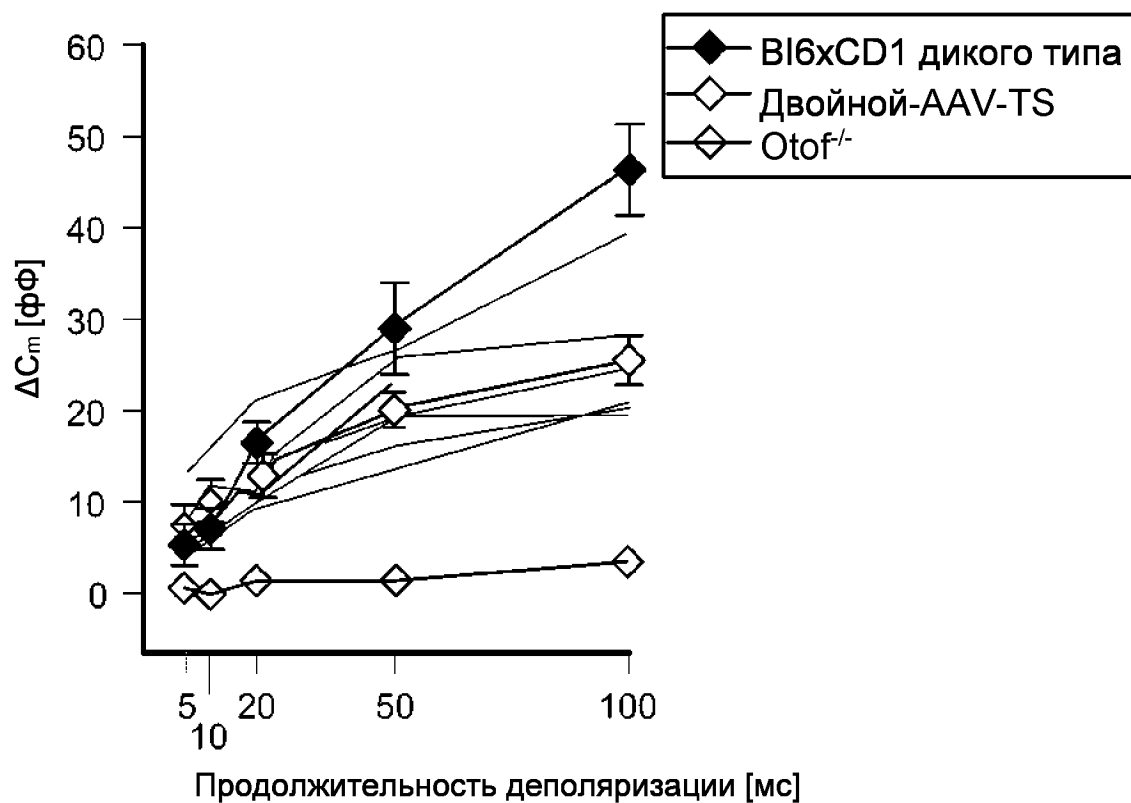
Фиг. 12



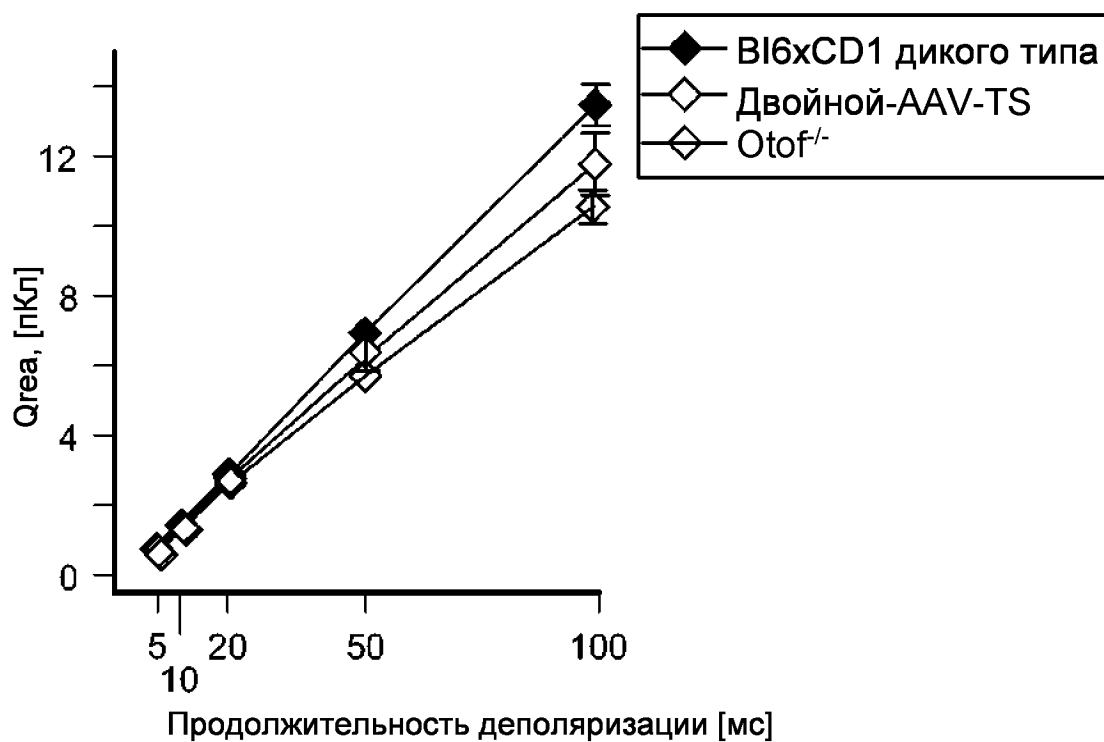
Фиг. 13



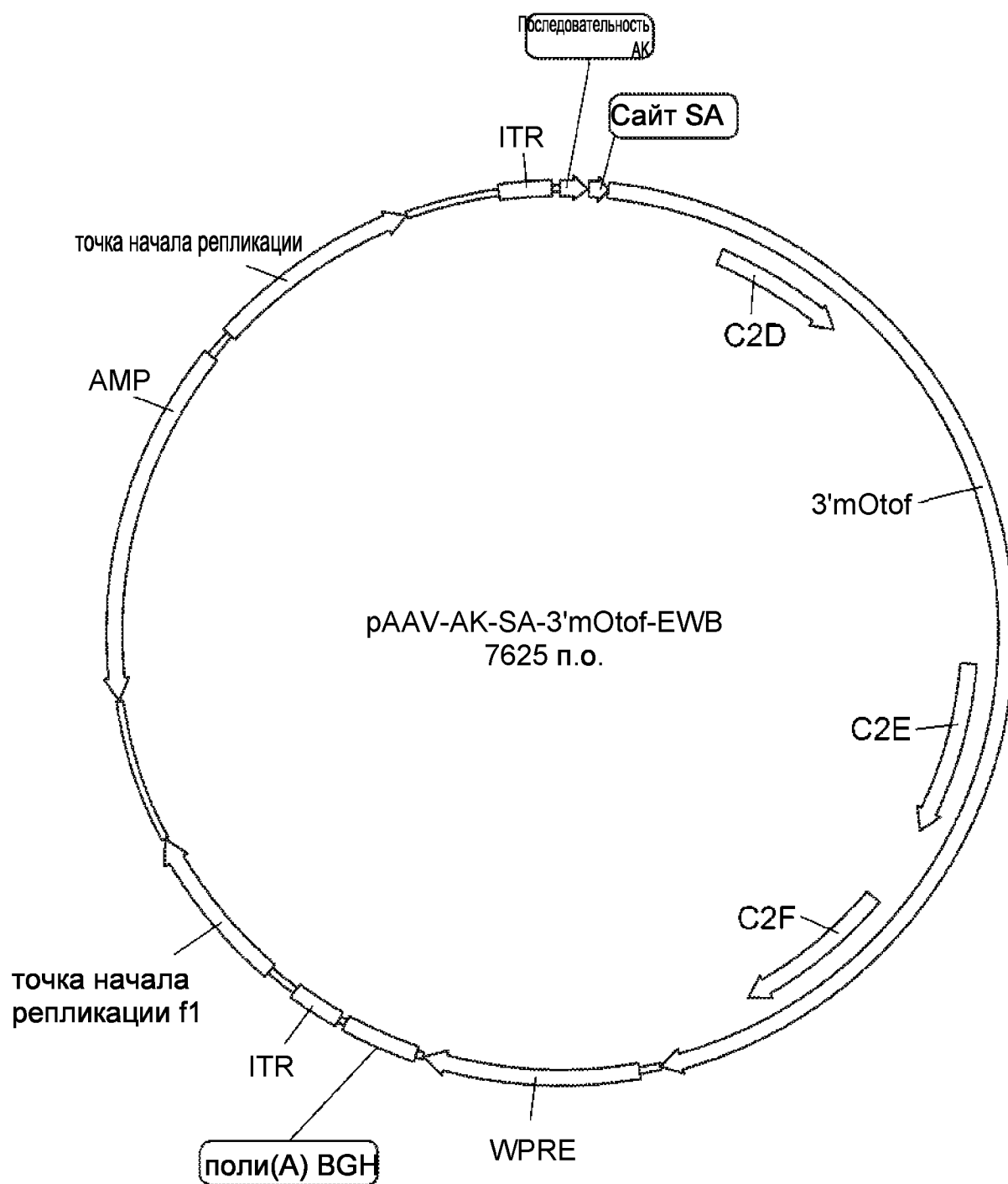
Фиг. 14



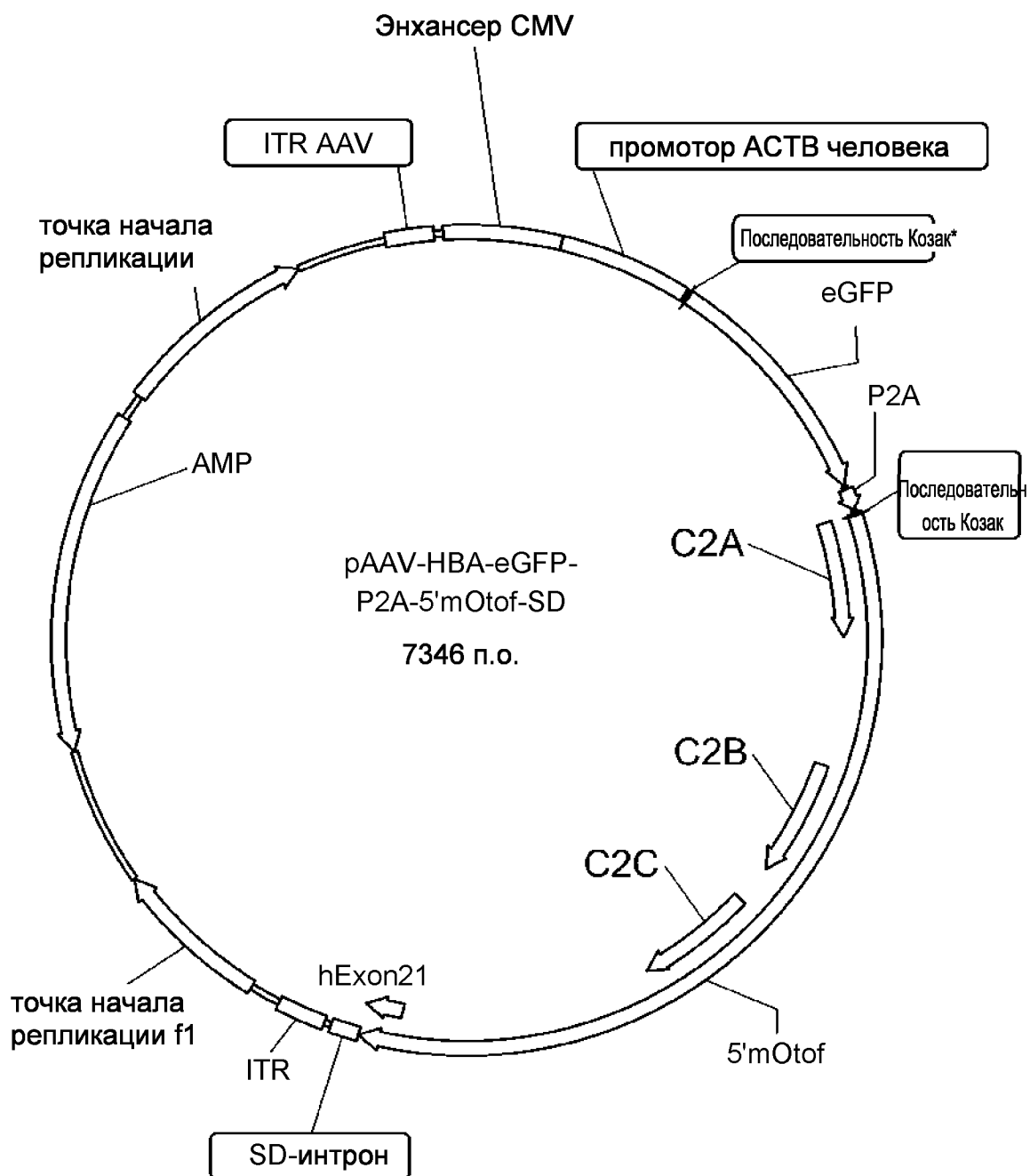
Фиг. 15



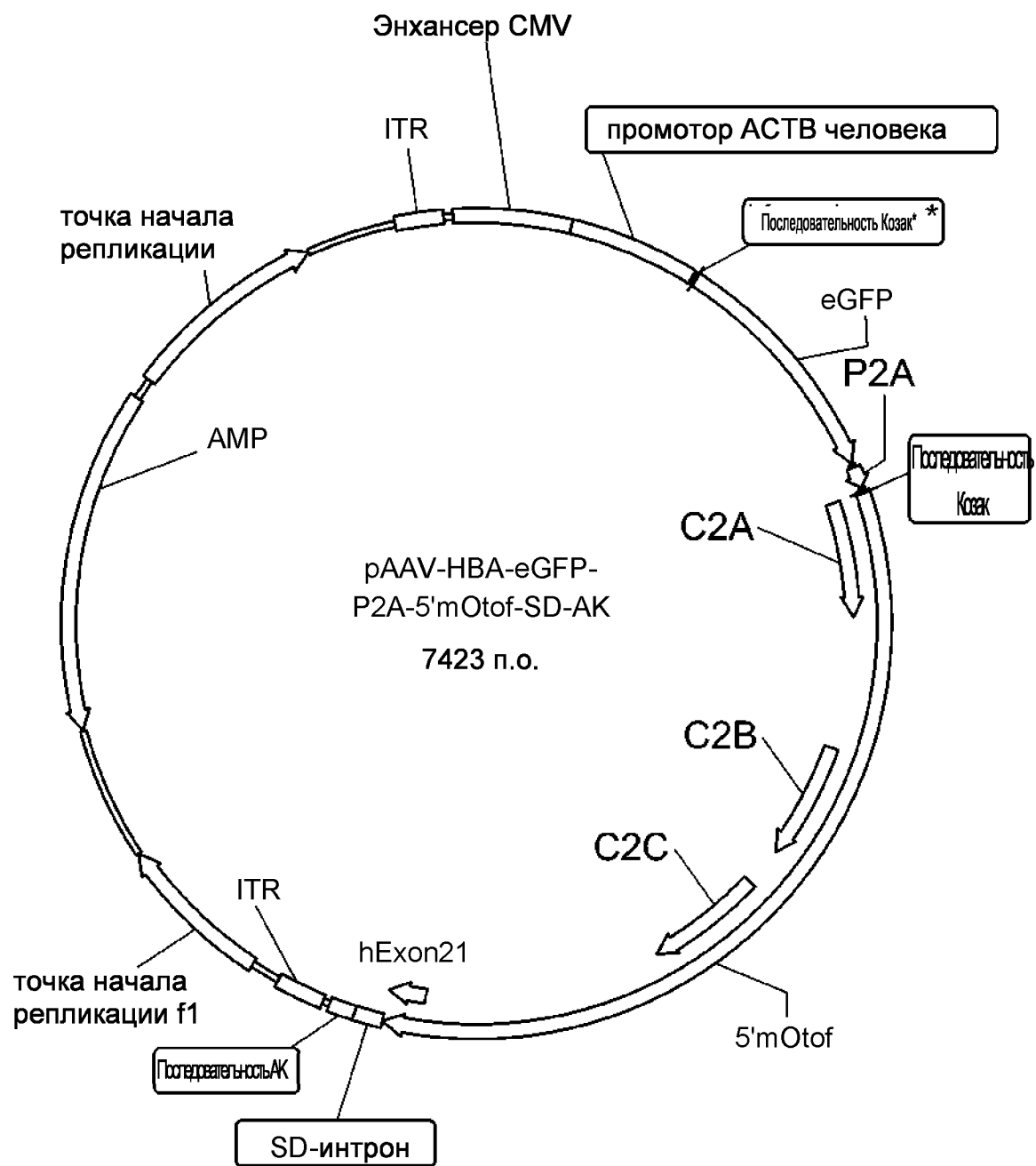
Фиг. 16



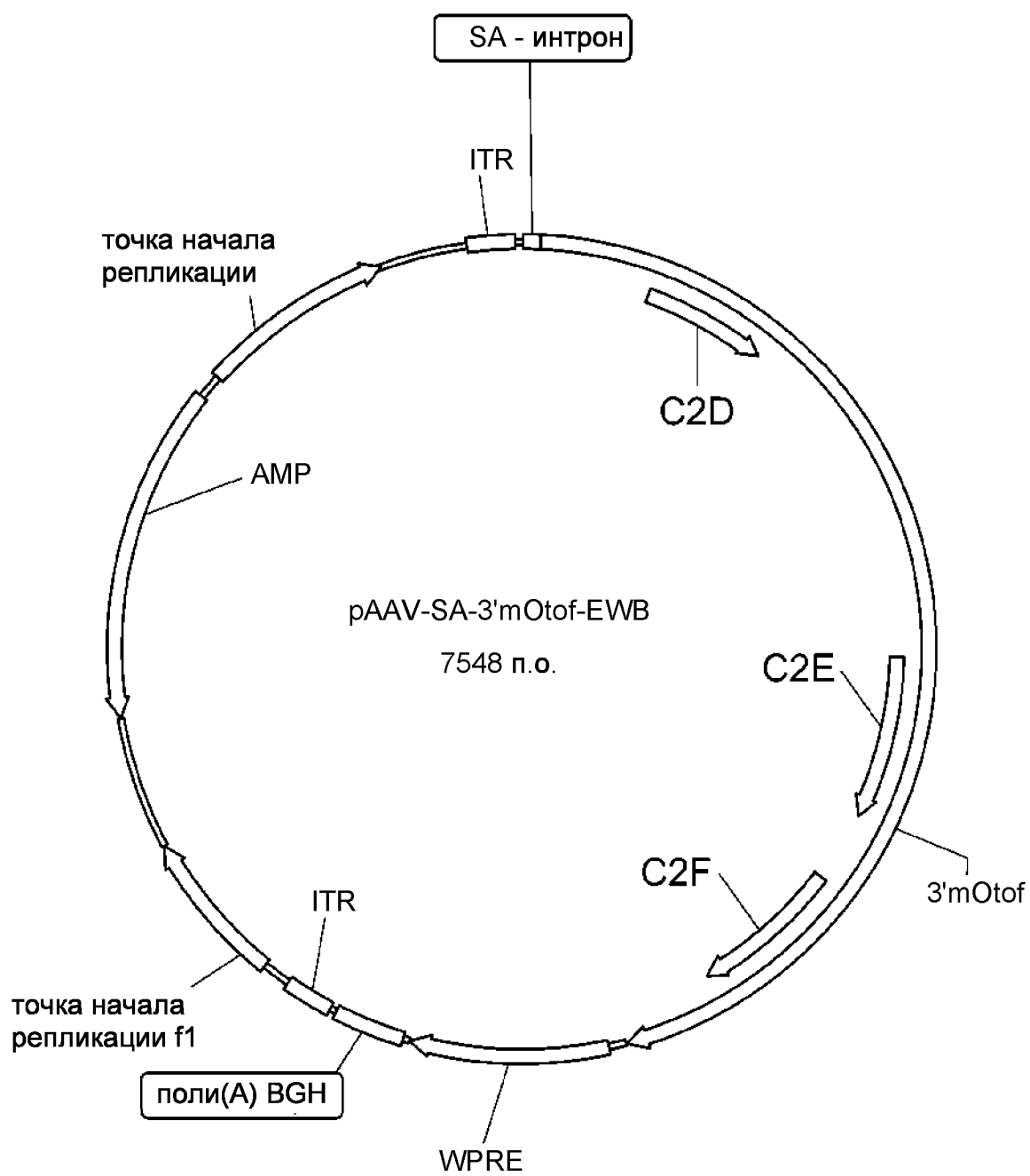
Фиг. 17



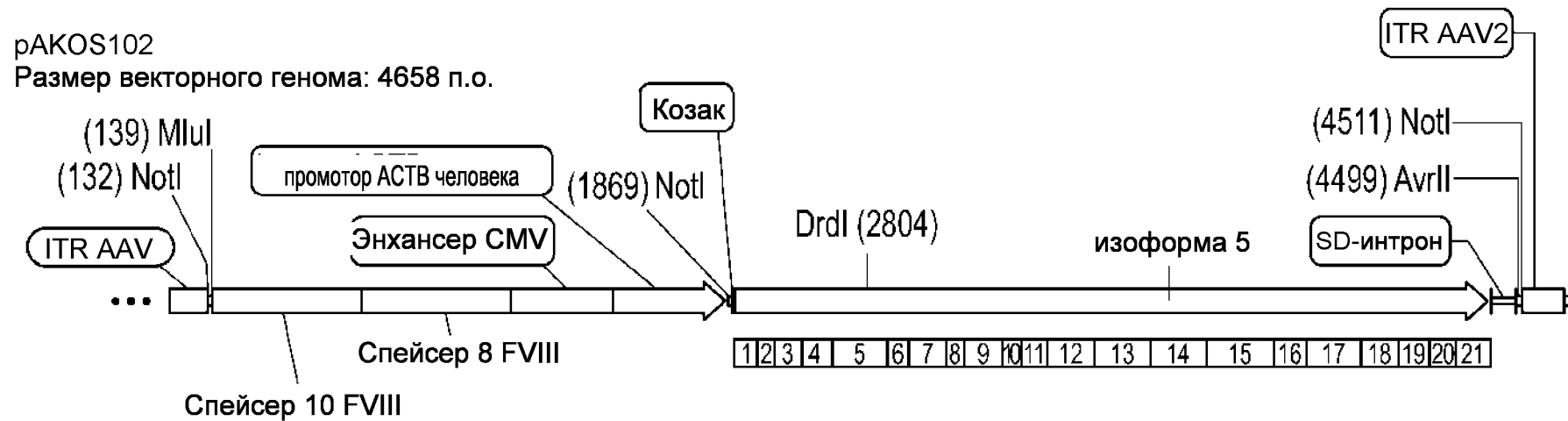
Фиг. 18



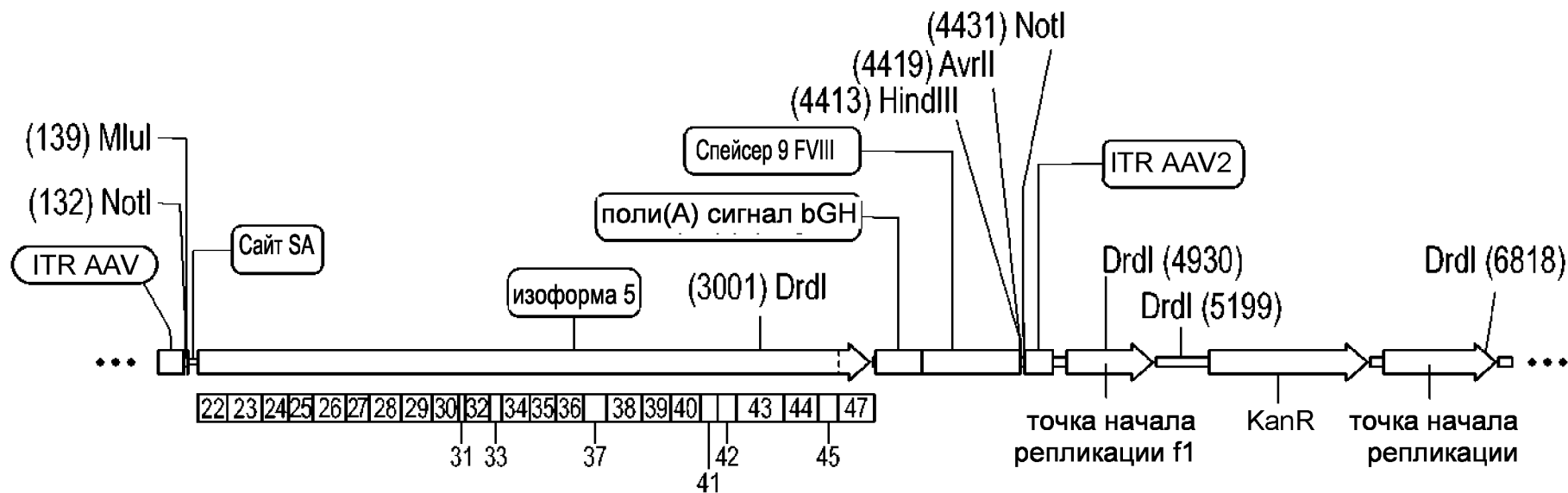
Фиг. 19



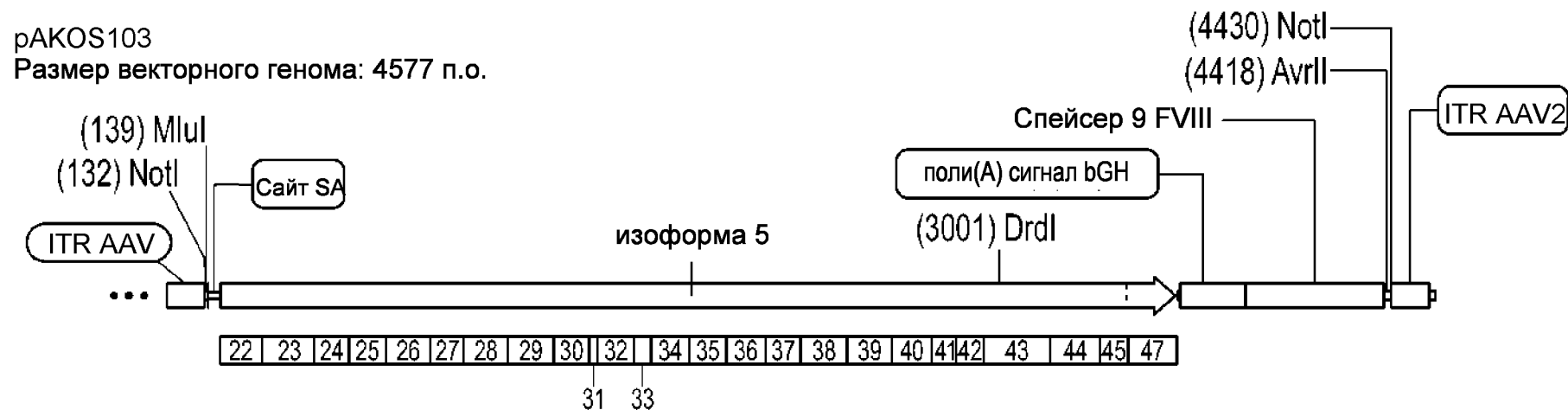
Фиг. 20



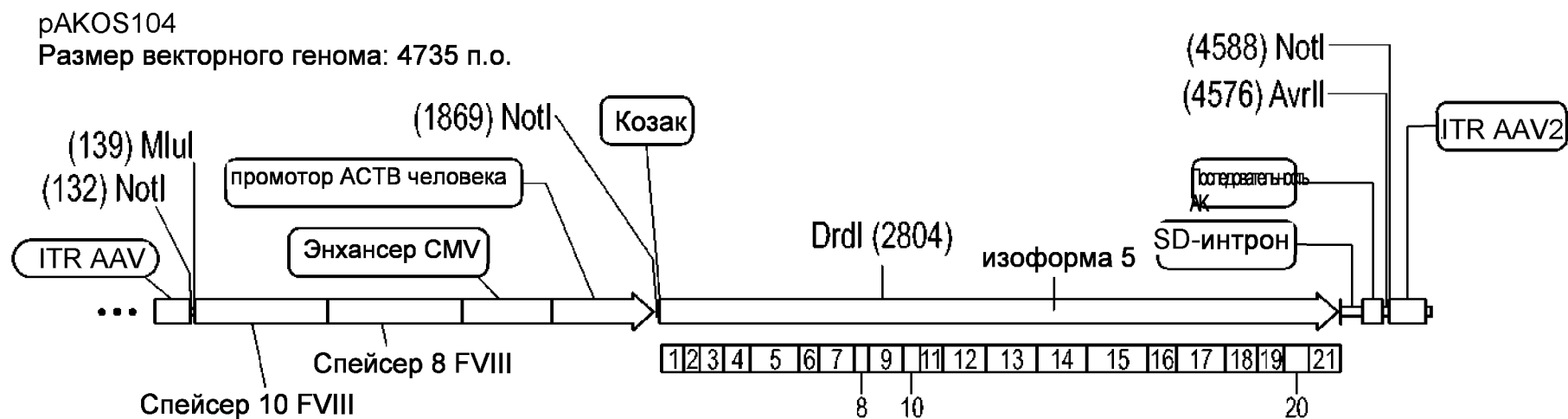
Фиг. 21



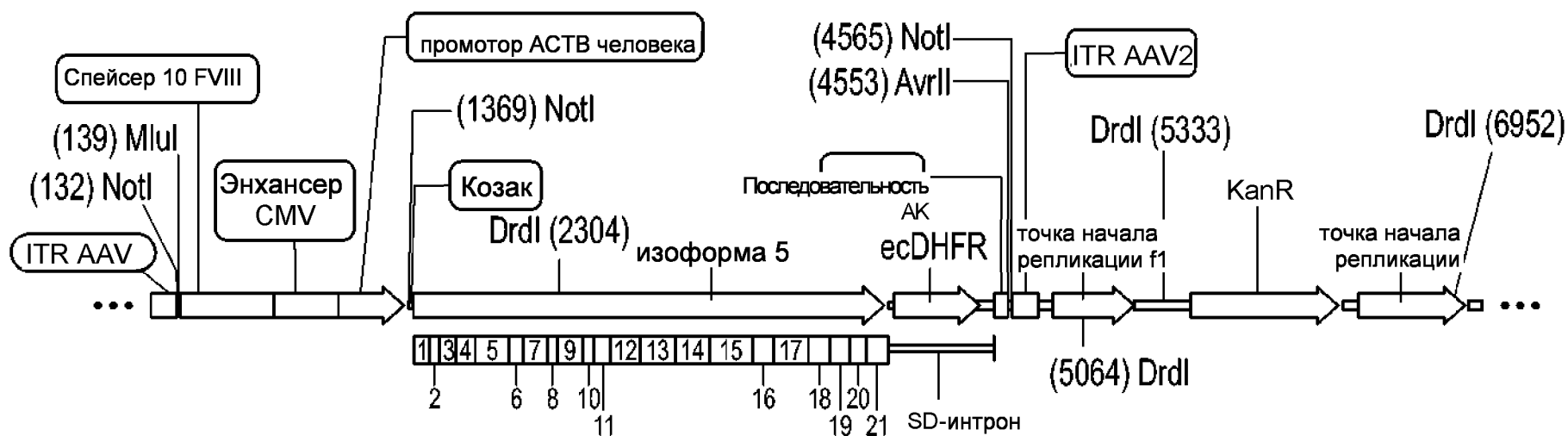
Фиг. 22



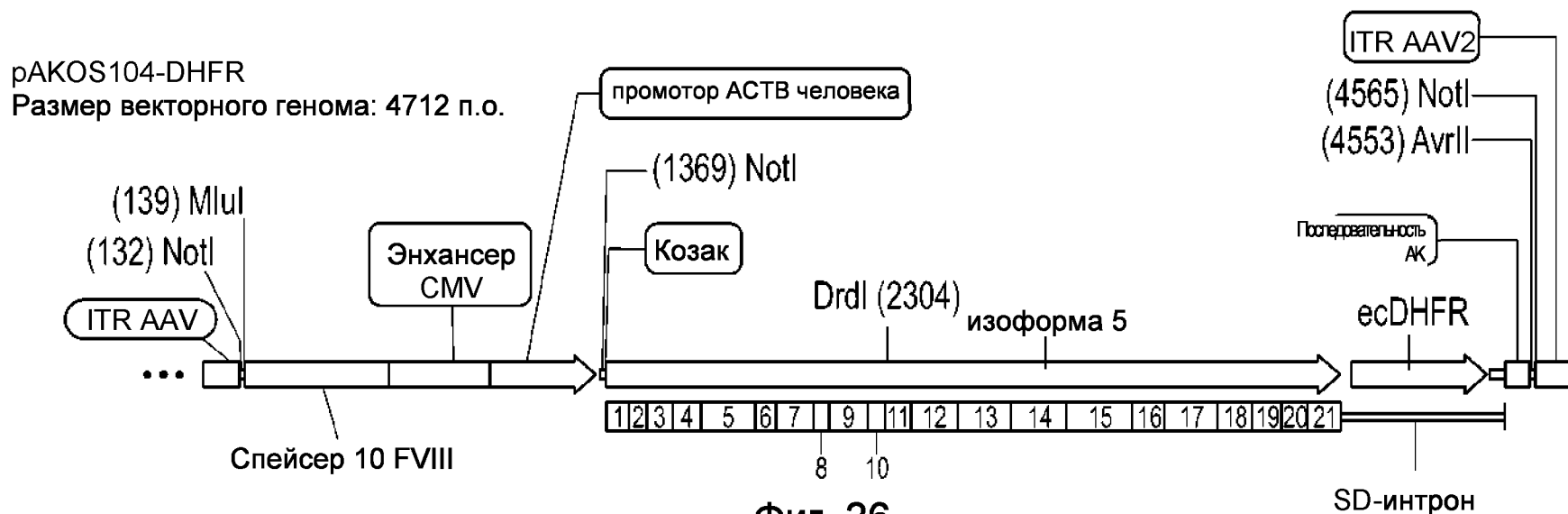
Фиг. 23



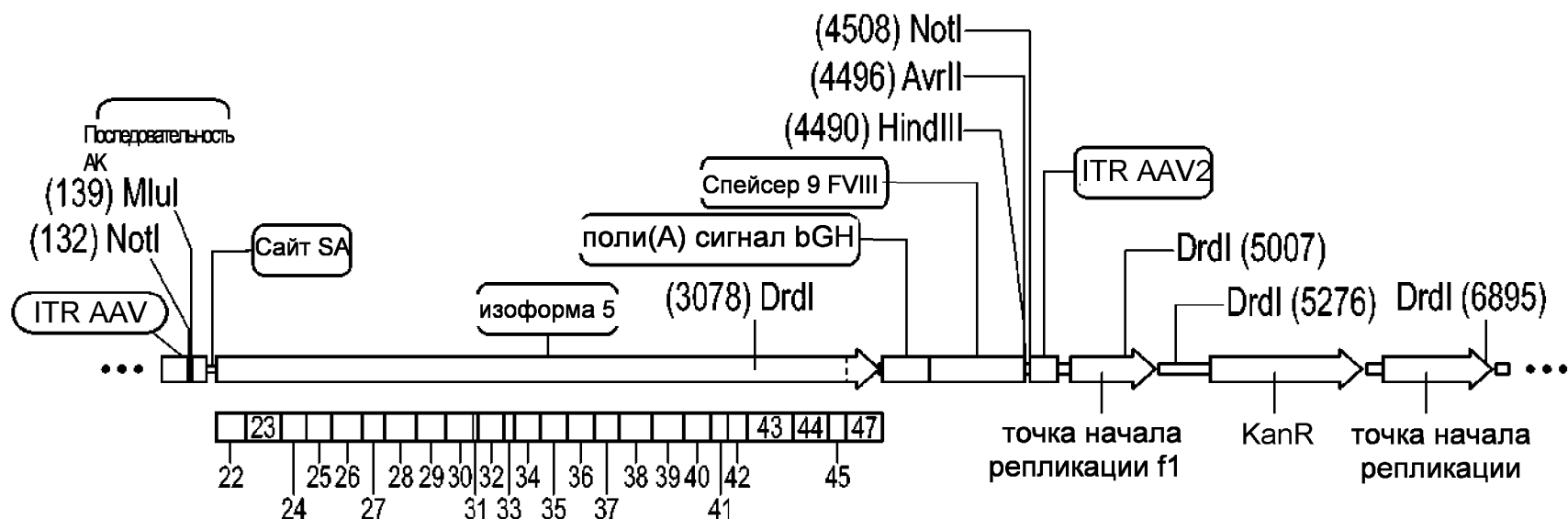
Фиг. 24



Фиг. 25

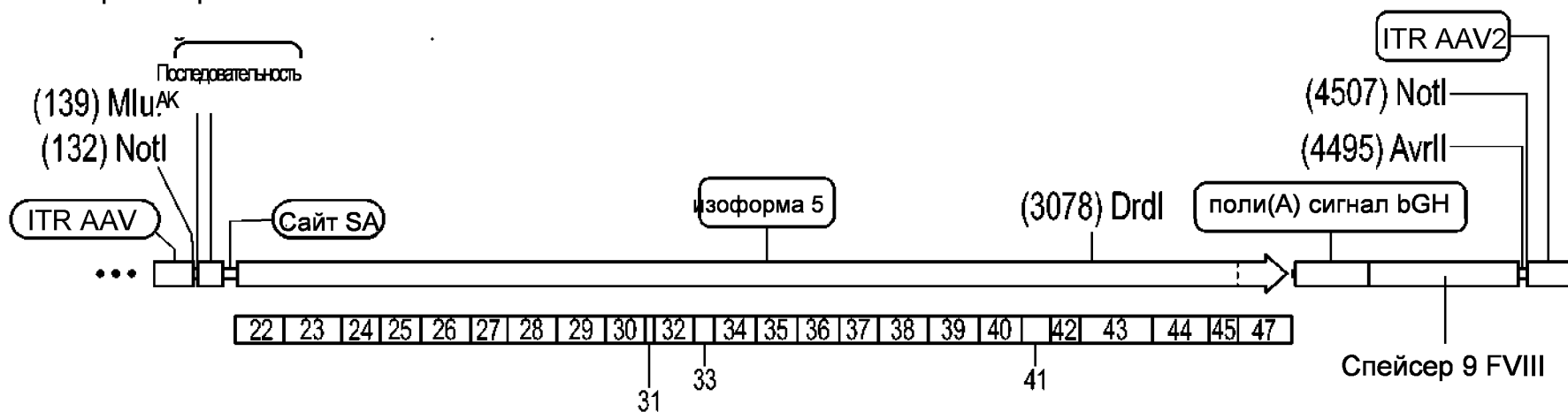


Фиг. 26

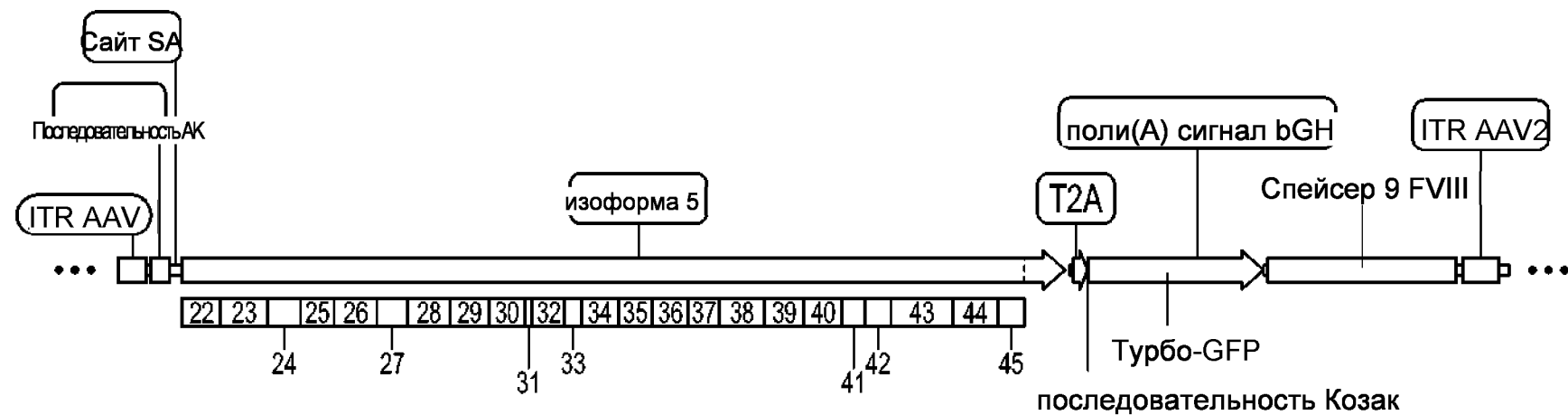


Фиг. 27

рAKOS105
Размер векторного генома: 4654 п.о.



Фиг. 28



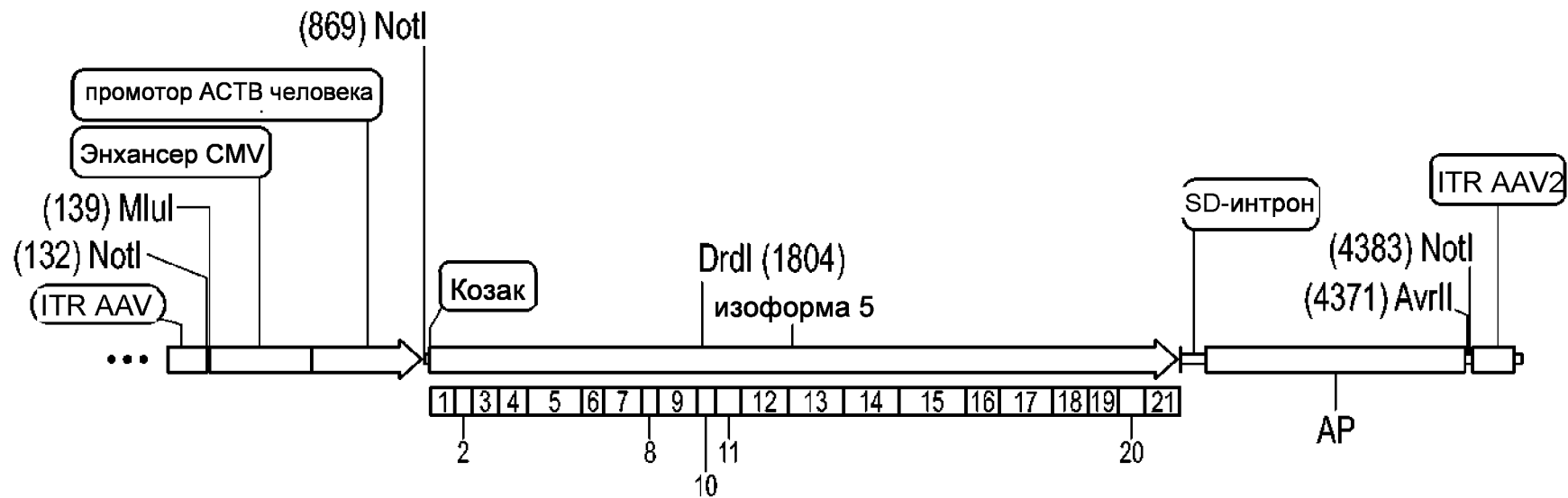
Фиг. 29



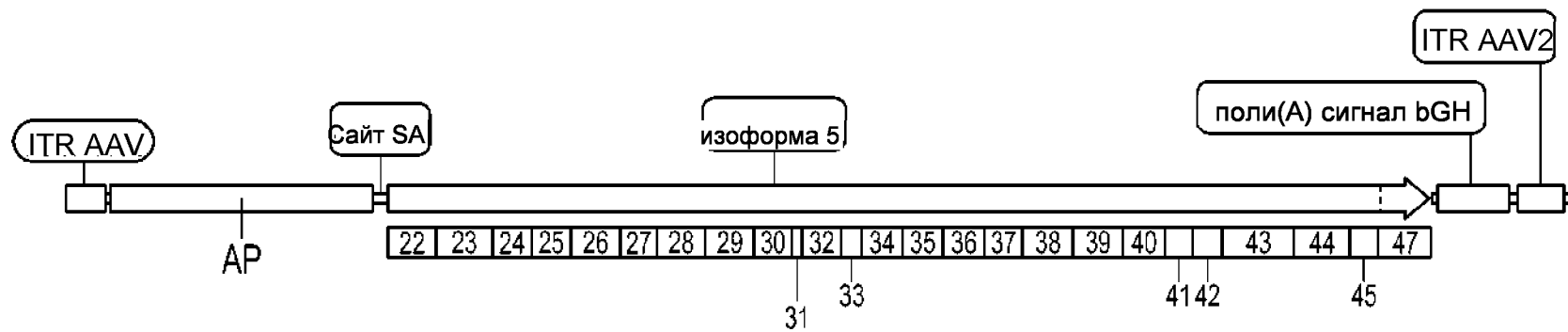
Фиг. 30

рAKOS107

Размер векторного генома: 4949 п.о.



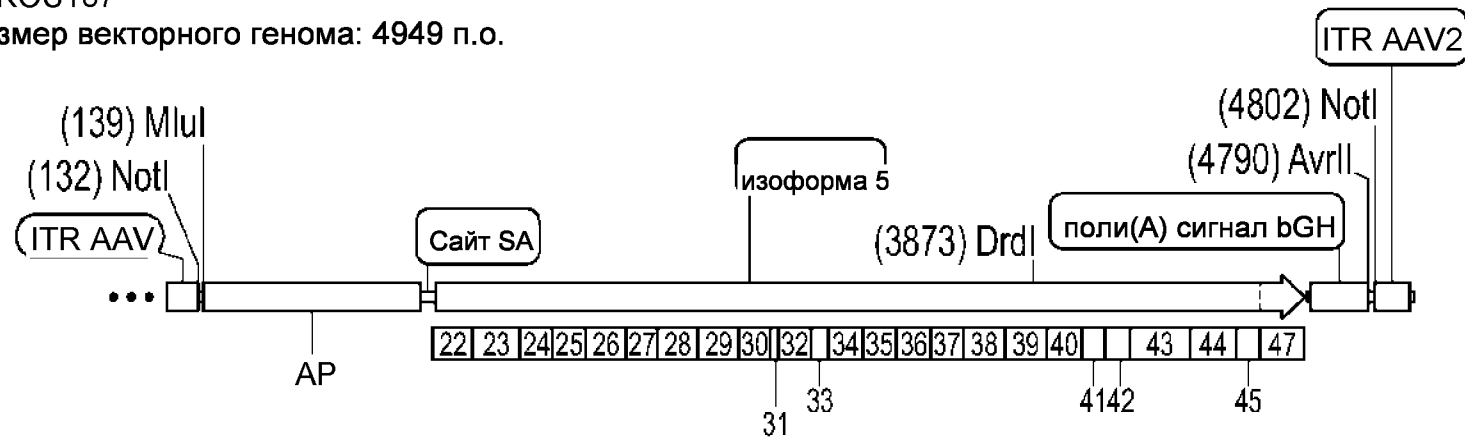
Фиг. 31



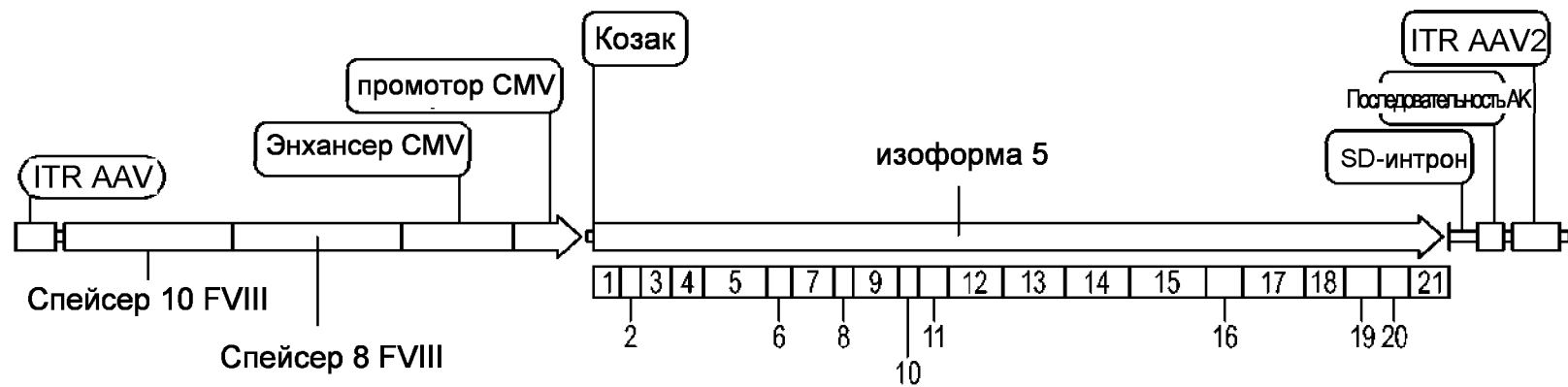
Фиг. 32

рAKOS107

Размер векторного генома: 4949 п.о.



Фиг. 33

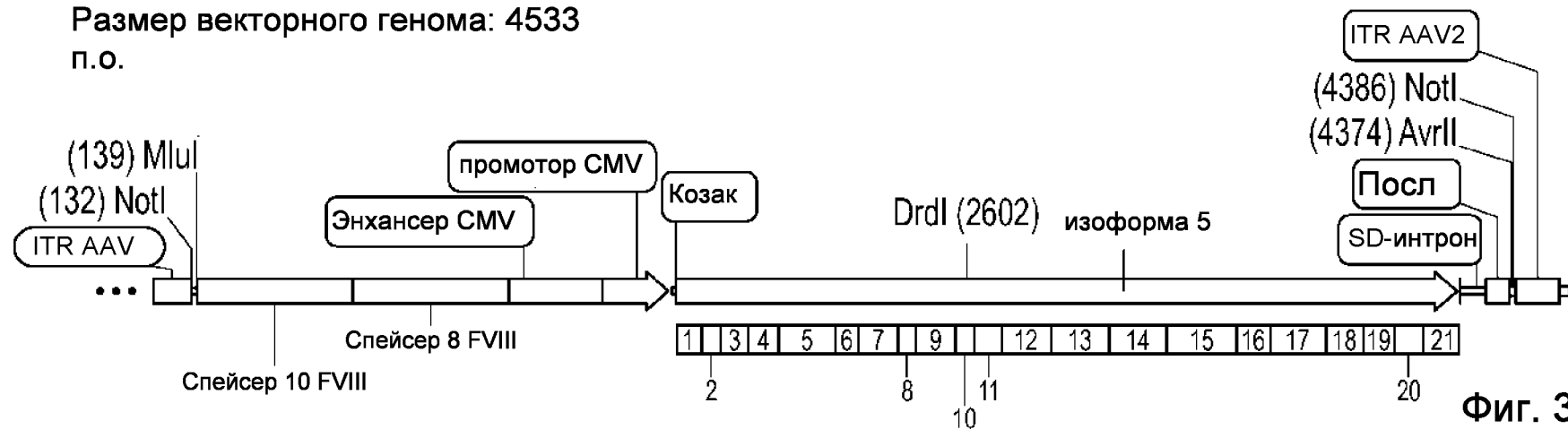


Фиг. 34

рAKOS108

Размер векторного генома: 4533

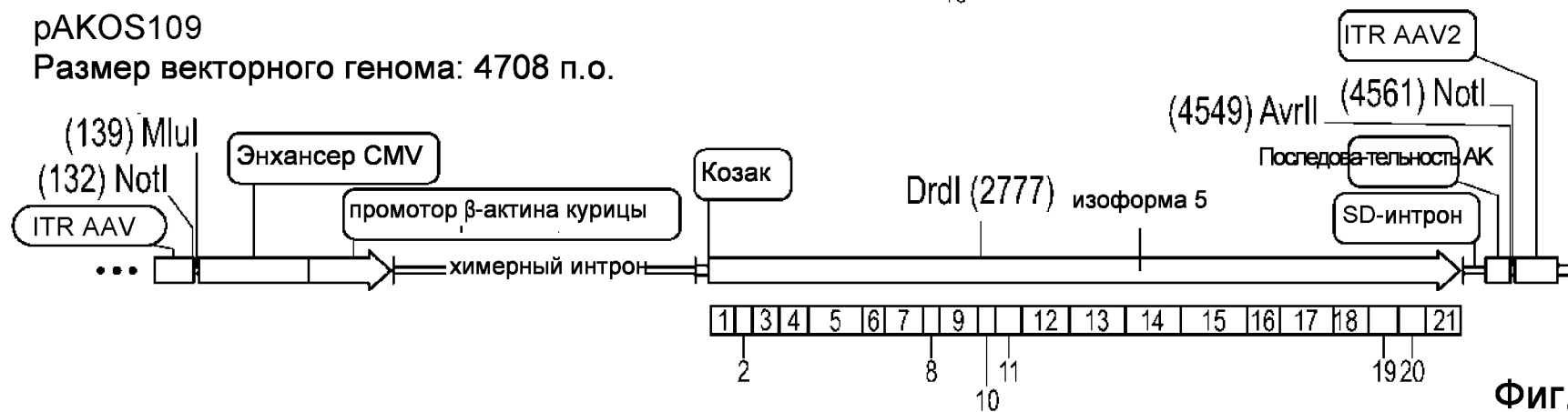
п.о.



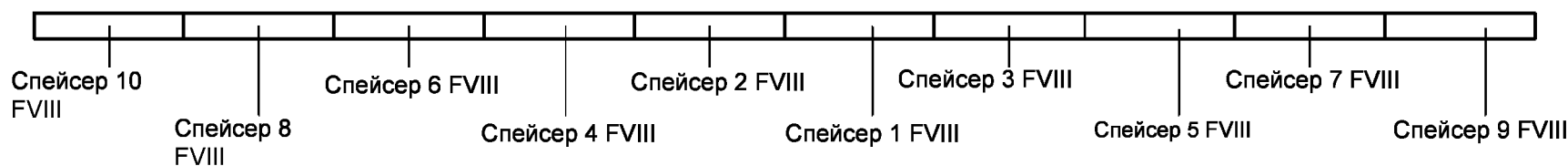
Фиг. 35

рAKOS109

Размер векторного генома: 4708 п.о.



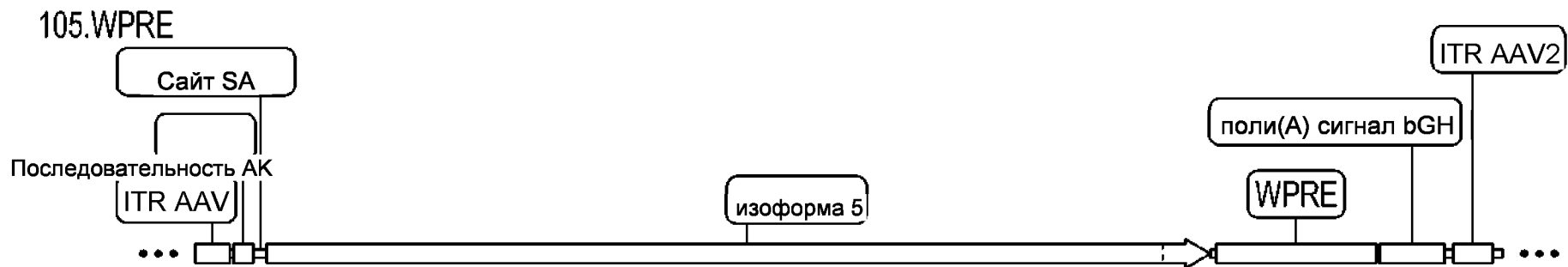
Фиг. 36



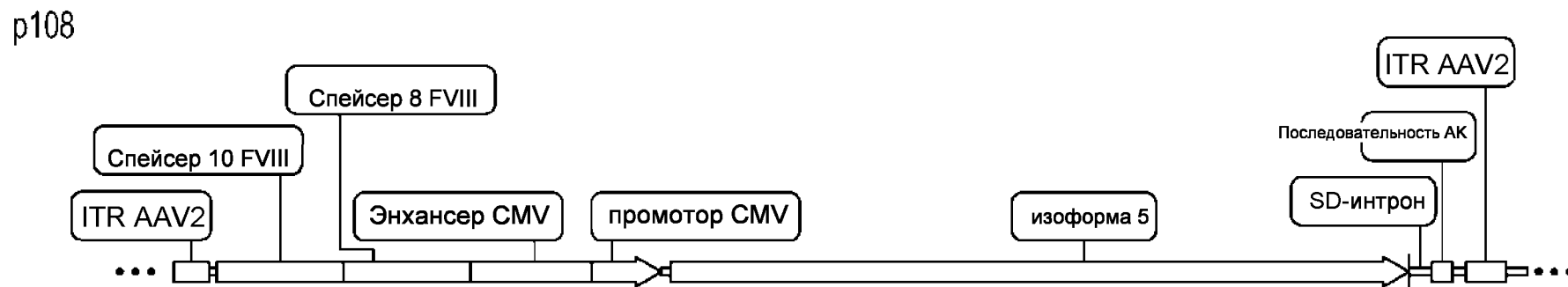
факторVIII_NM_000132
5000 п.о.

Фиг. 37





Фиг. 40

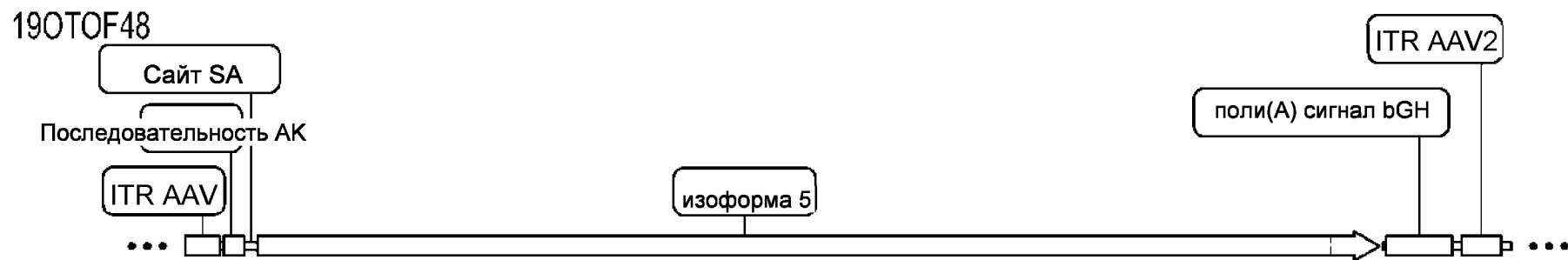


Фиг.41



Фиг. 42

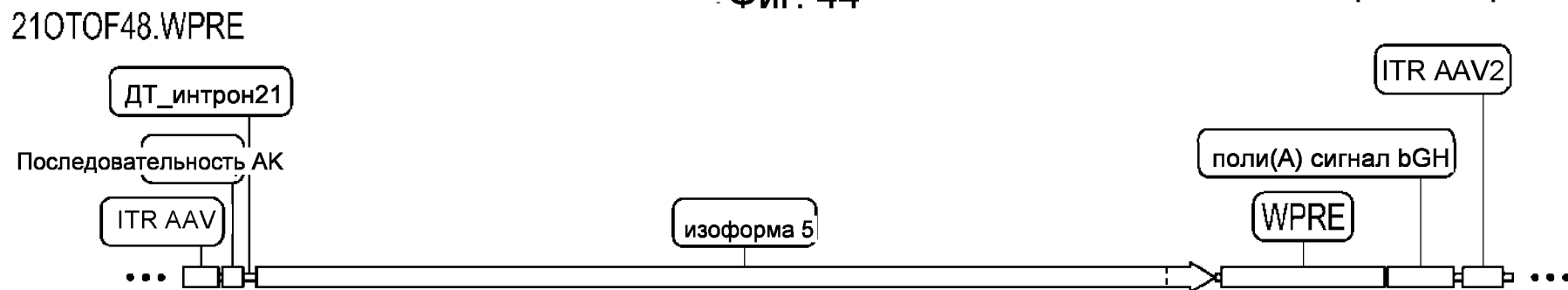
2214 п.о.



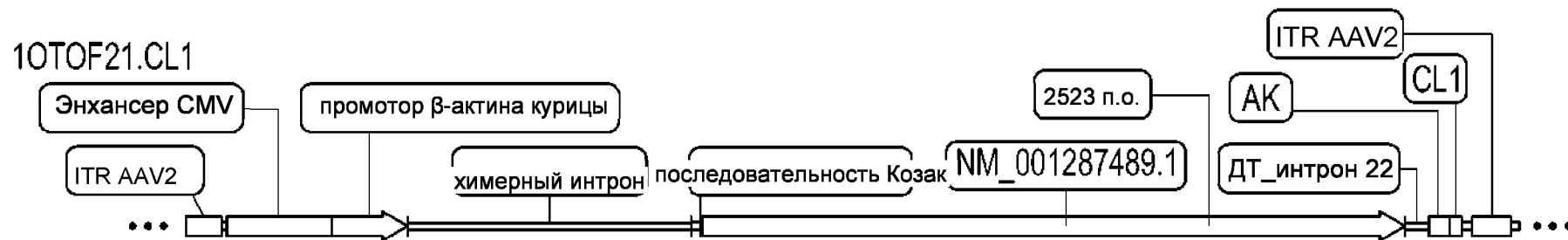
Фиг. 43



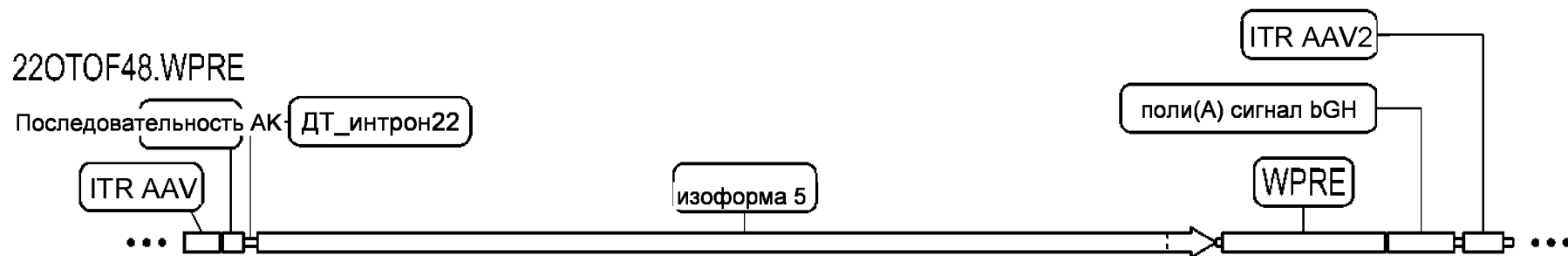
Фиг. 44



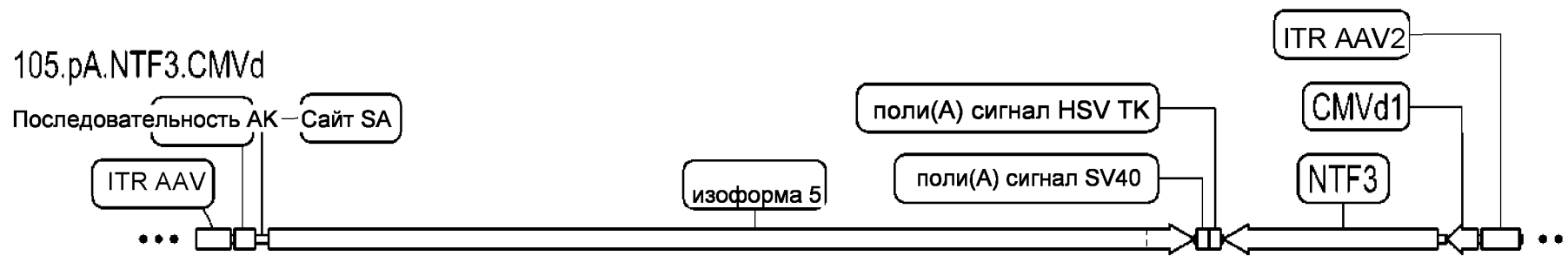
Фиг. 45



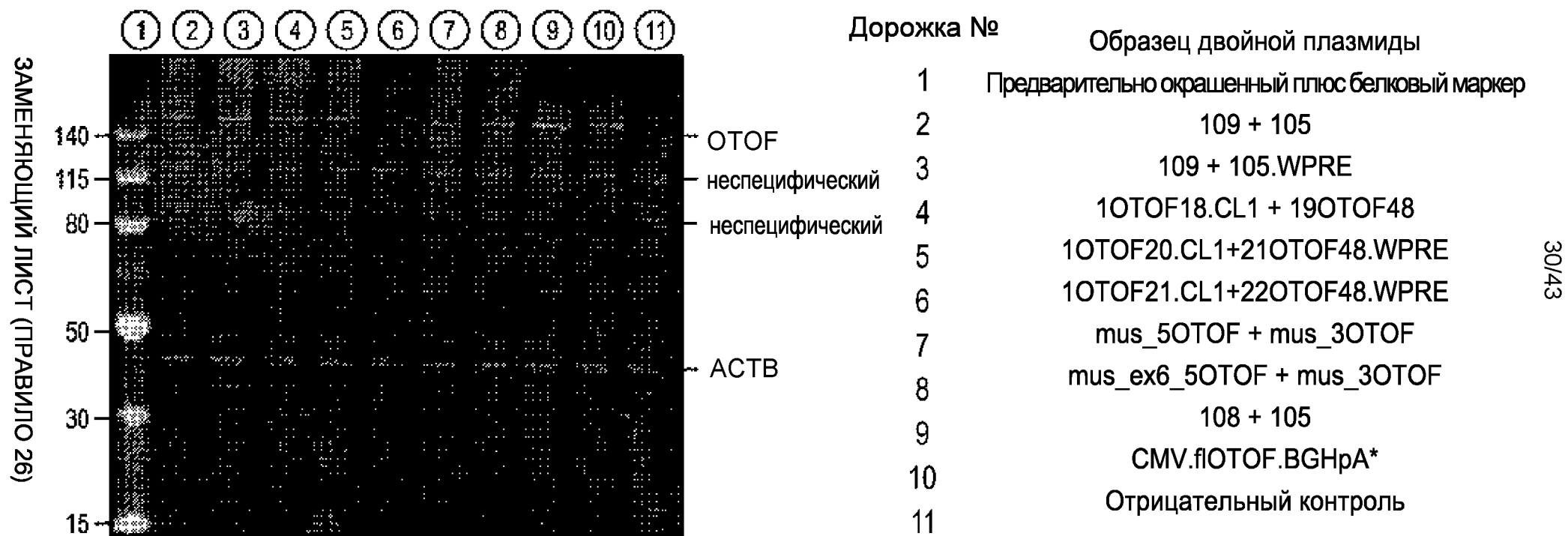
Фиг. 46



Фиг. 47



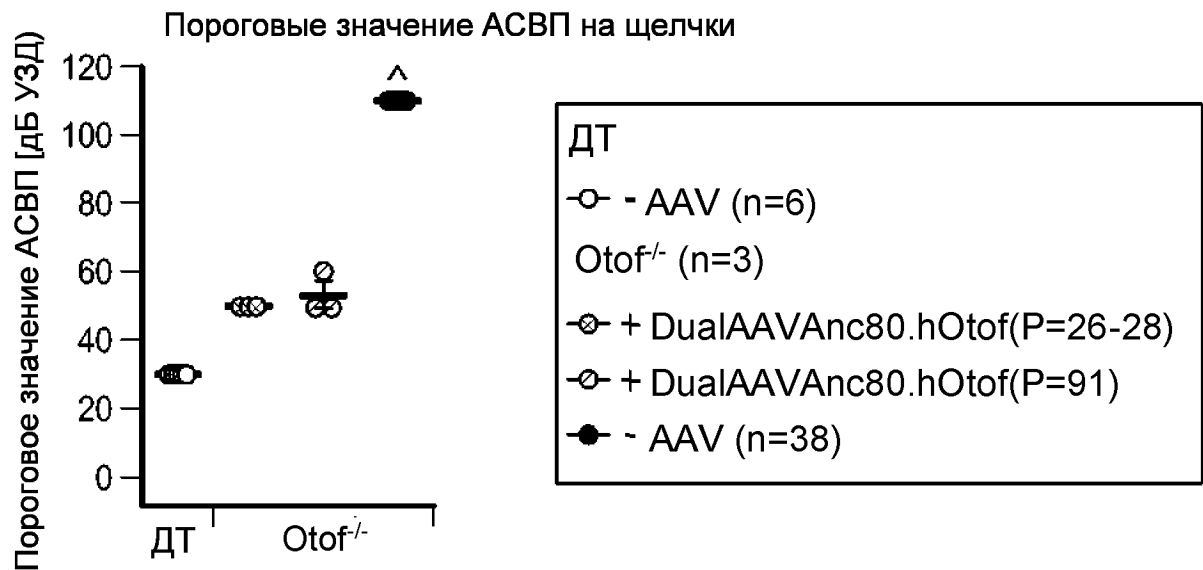
Фиг. 48



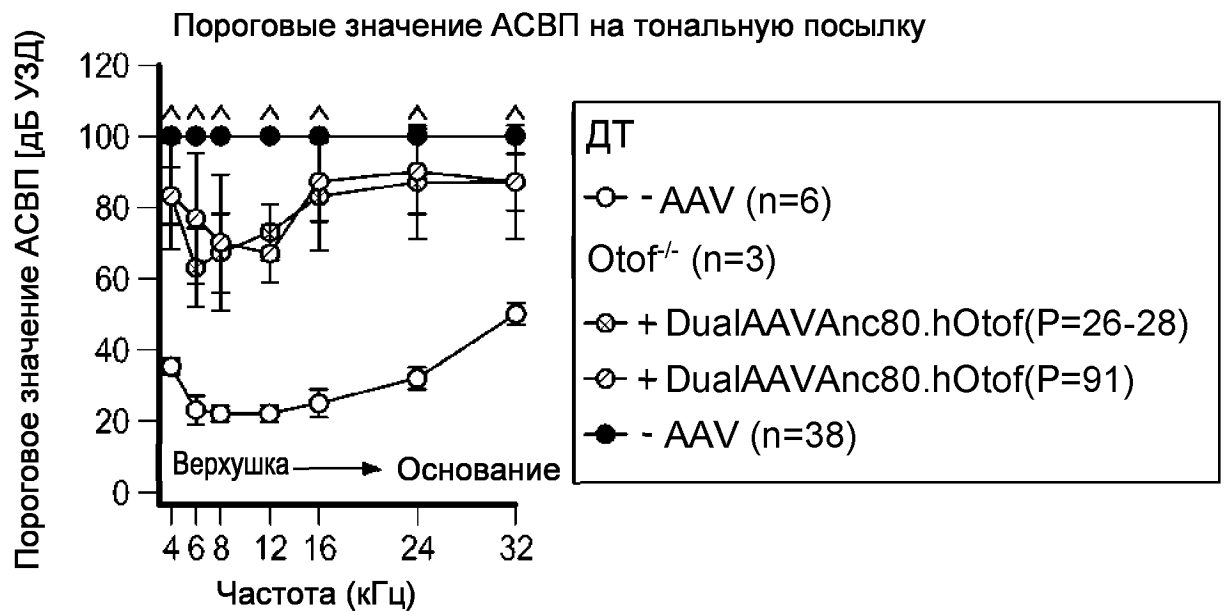
Фиг. 49

400 нг	400 нг	Эксперимент 1			Эксперимент 2			Эксперимент 3			Конечный		
Плазмида 1	Плазмида 2	I.I. АСТВ	I.I. ОТОФ	Соотно- шение	I.I. АСТВ	I.I. ОТОФ	Соотно- шение	I.I. АСТВ	I.I. ОТОФ	Соотно- шение	Среднее	станд.откл.	%CV
109	105	22.29	0.12	0.005	18.57	0.39	0.021	13.41	0.13	0.010	0.012	0.01	67.07
109	105WPRE	18.46	0.23	0.012	19.32	0.82	0.042	16.37	0.28	0.017	0.024	0.02	67.24
10TOF18.CL1	190TOF48	18.15	0.17	0.009	17.11	0.36	0.021	18.84	0.28	0.015	0.015	0.01	38.70
10TOF20.CL1	210TOF48.WPRE	19.47	0.30	0.015	16.52	0.22	0.013	16.97	0.15	0.009	0.013	0.00	26.80
10TOF21.CL1	220TOF48.WPRE	18.31	0.04	0.002	17.07	0.03	0.002	18.32	0.00	0.000	0.001	0.00	Н/Д
mus_5OTOФ	mus_3OTOФ	17.37	1.00	0.058	17.97	0.36	0.020	18.77	0.32	0.017	0.032	0.02	71.58
mus_ex6_5OTOФ	mus_3OTOФ	16.06	0.71	0.044	16.11	0.53	0.033	16.08	0.13	0.008	0.028	0.02	65.07
108	105	15.49	1.06	0.068	15.77	0.91	0.058	18.38	0.27	0.015	0.047	0.03	60.59
CMV.fl.OTOФ	CMV.fl.OTOФ	18.17	0.48	0.026	16.29	0.50	0.031	14.54	0.62	0.043	0.033	0.01	25.29
Н/Д	Н/Д	19.10	0.01	0.001	16.94	-0.01	-0.001	14.73	-0.01	-0.001	0.000	0.00	Н/Д

Фиг. 50

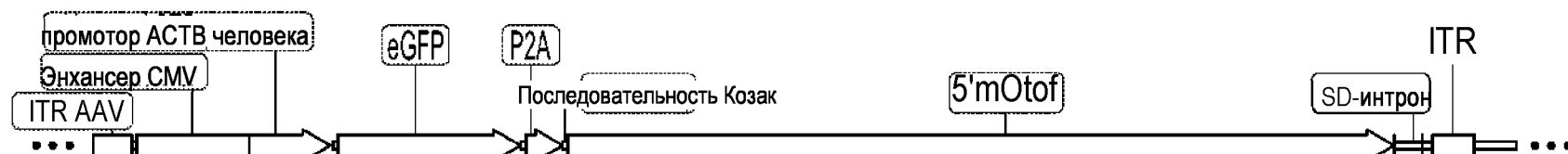


Фиг. 51



Фиг. 52

4472 п.о.

[illegible]

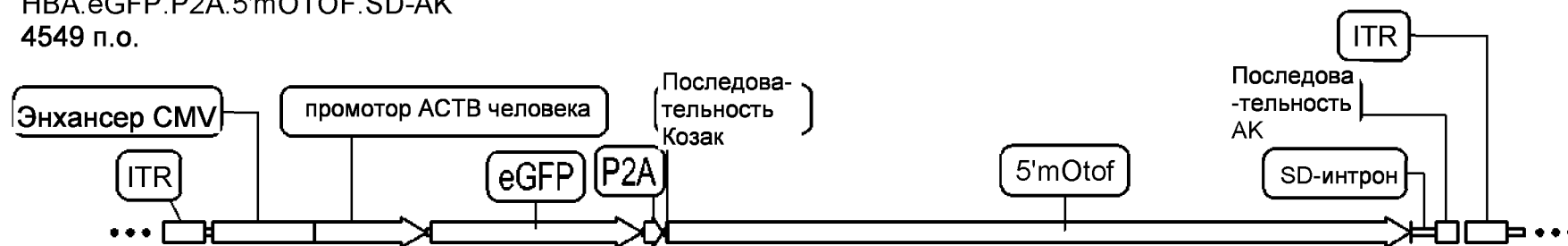
TR CMV/HBA GFP 5'mOtof Donor сплайсинга

Фиг. 53

TR Акцептор спласинга 3'OTOF WPRE BGHpa

ФИГ. 54

HBA.eGFP.P2A.5'mOTOF.SD-AK
4549 п.о.



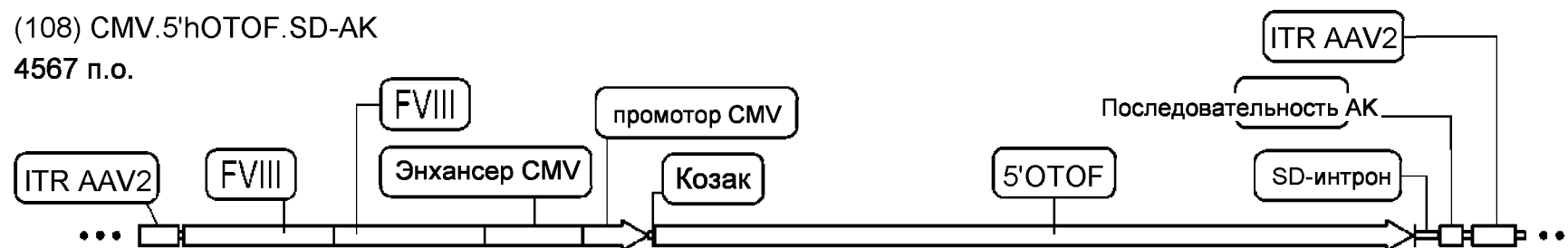
Фиг. 55

AK-SA.3'mOTOF.WPRE
4751 п.о.



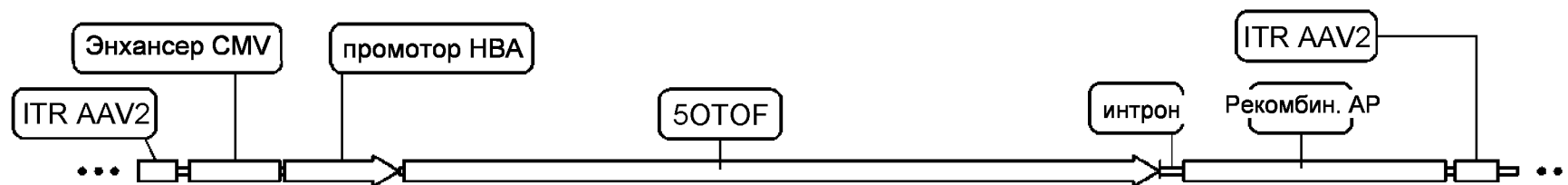
Фиг. 56

(108) CMV.5'hOTOF.SD-AK
4567 п.о.



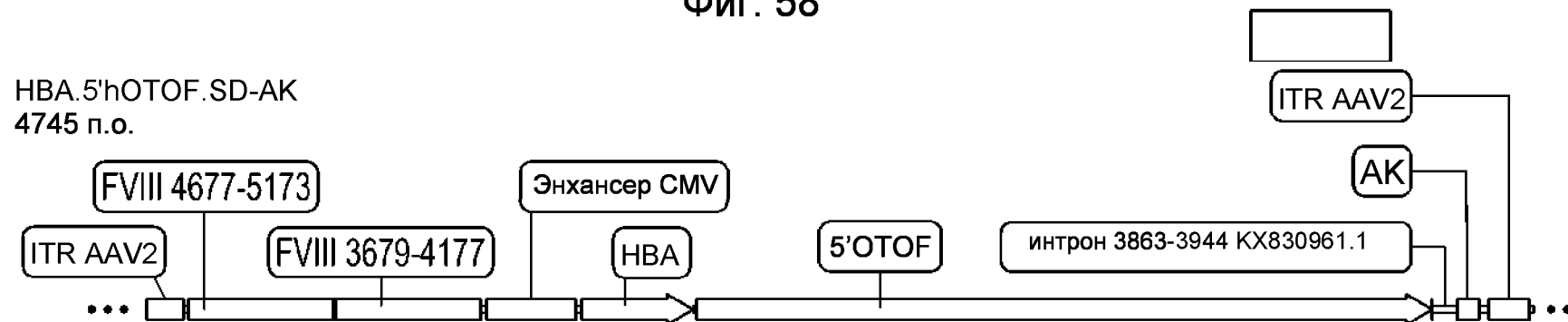
Фиг. 57

HBA.5'hOTOF.SD-AP
4540 п.о.



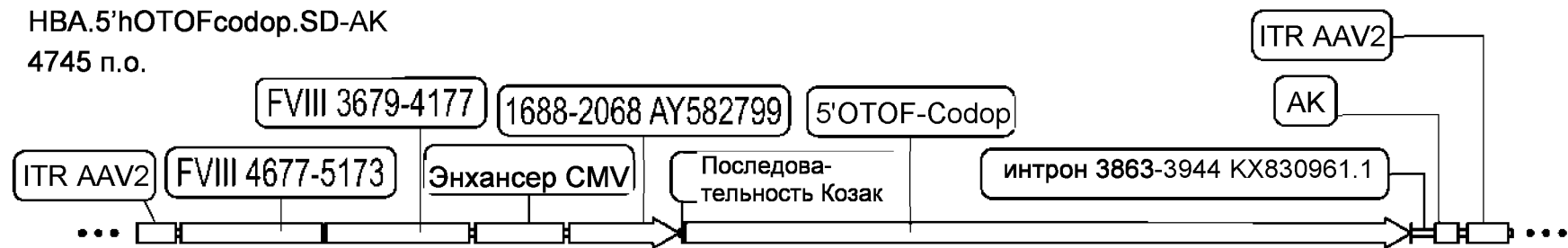
Фиг. 58

HBA.5'hOTOF.SD-AK
4745 п.о.



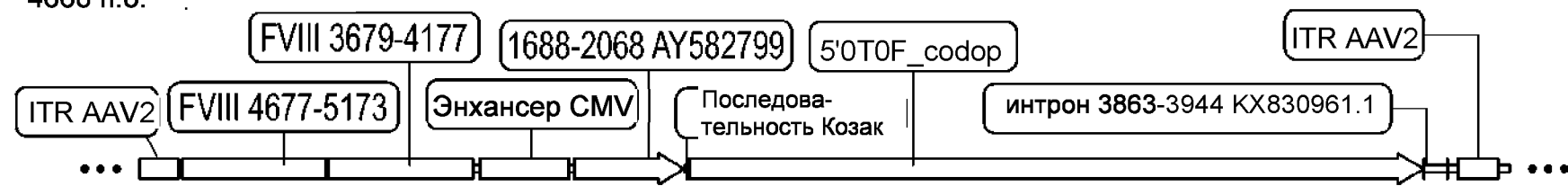
Фиг. 59

HBA.5'hOTOFcodop.SD-AK
4745 п.о.



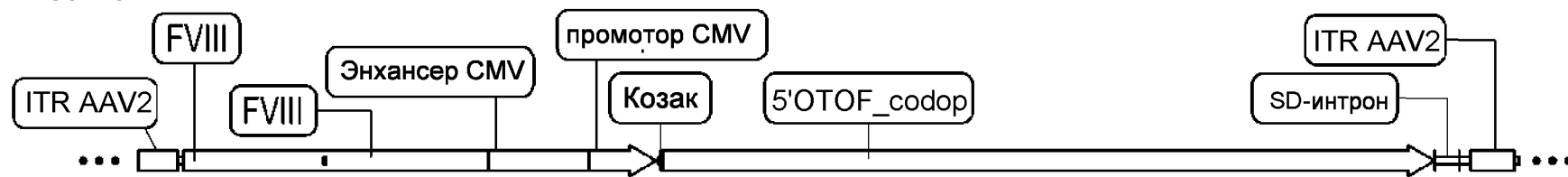
Фиг. 60

HBA.5'hOTOFcodop.SD
4668 п.о.



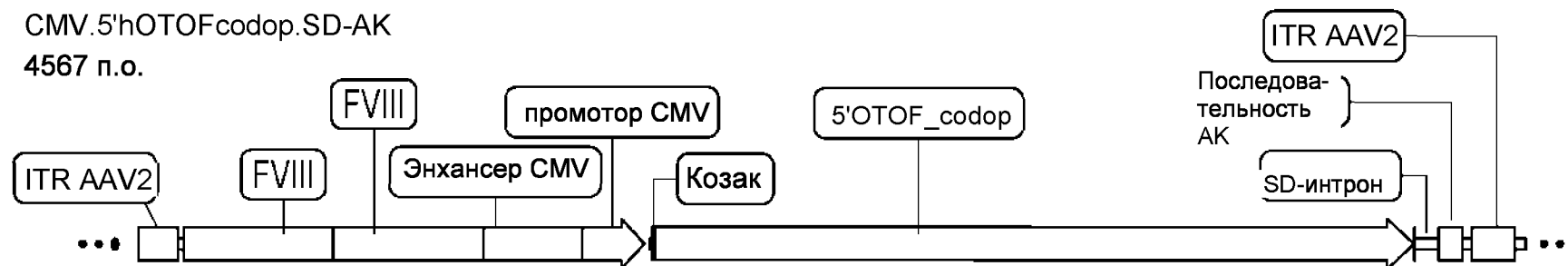
Фиг. 61

CMV.5'hOTOFcodop.SD
4490 п.о.



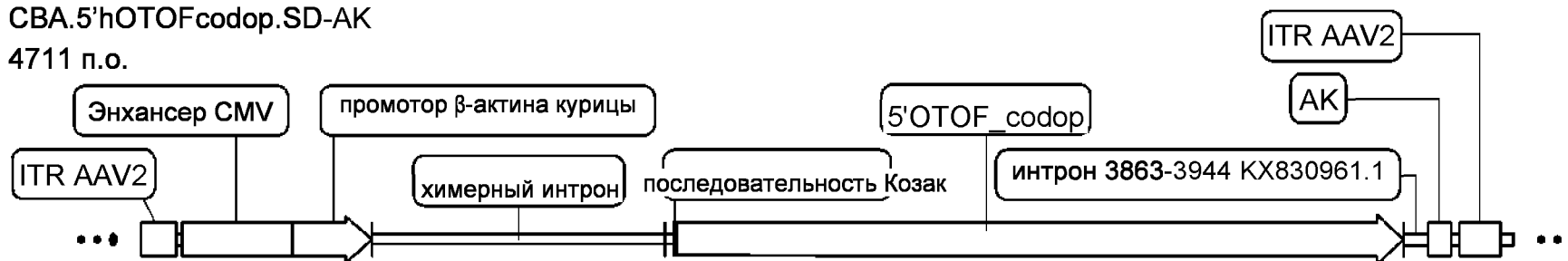
Фиг. 62

CMV.5'hOTOFcodop.SD-AK
4567 п.о.



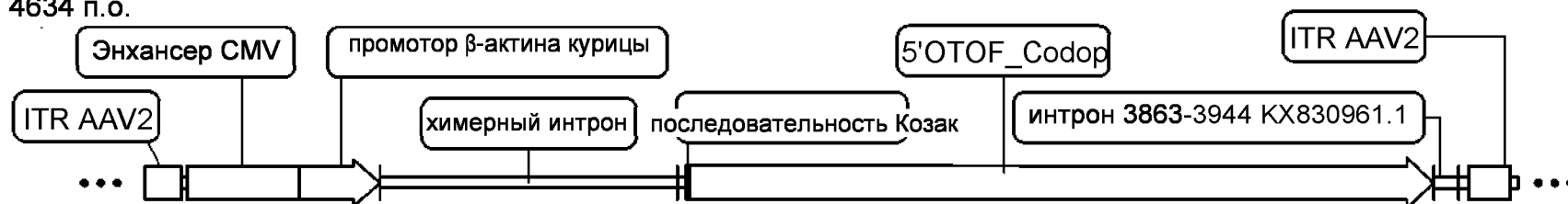
Фиг. 63

CBA.5'hOTOFcodop.SD-AK
4711 п.о.



Фиг. 64

CBA.5'hOTOFcodop.SD
4634 п.о.



Фиг. 65

SA.3'OTOF
4587 п.о.

ITR AAV

Сайт SA

3'OTOF

поли(А) сигнал bGH

ITR AAV2

Спейсер 9 FVIII

Фиг. 66

AP-SA.3'OTOF
4959 п.о.

ITR AAV2

Рекомбин.
AP

SA

3'OTOF

поли(А) сигнал bGH

ITR AAV2

Фиг. 67

AP-SA.3'OTOFcodop
4664 п.о.

Последова-
тельность

AK

ITR AAV

Сайт SA

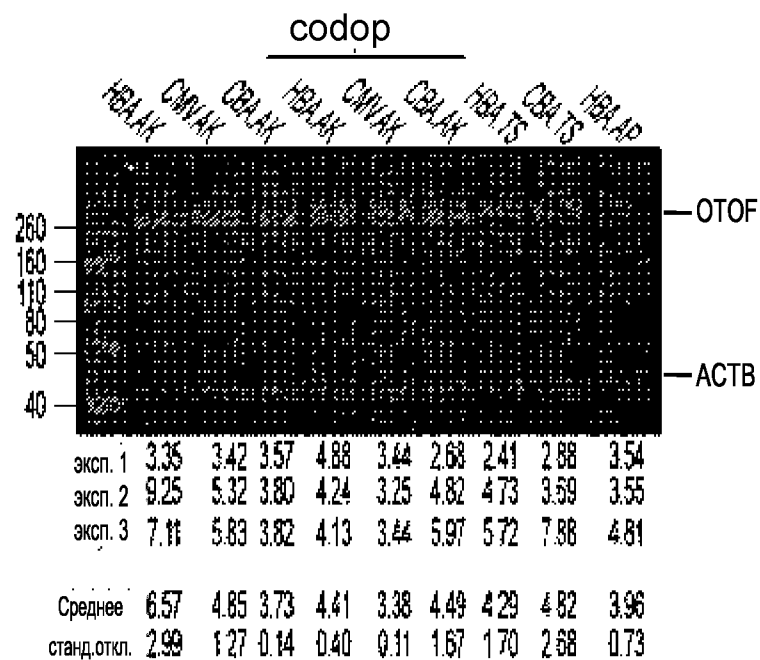
3'OTOF_codop

поли(А) сигнал bGH

ITR AAV2

FVIII

Фиг. 68



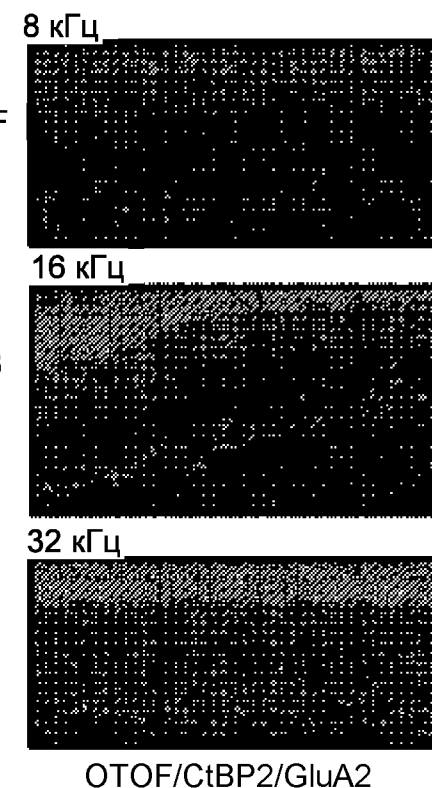
Фиг. 69



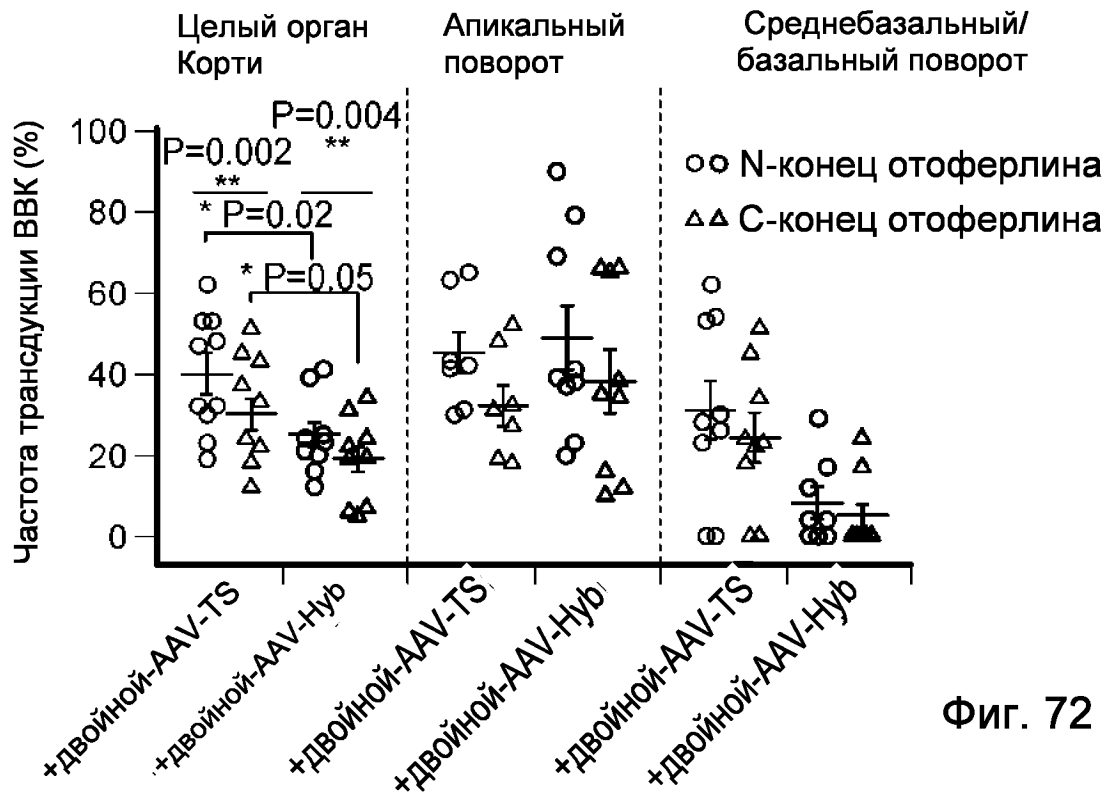
1. CBA.OTOF(AK)- MOI 503 тыс.
2. CBA.OTOF(AK)-MOI 1510 тыс.
3. CBA.OTOF(AK)-MOI 100 тыс.
4. CBA.OTOF(AK)- MOI 303 тыс.
5. CMV.OTOF AK)- MOI 638 тыс.
6. CMV.OTOF AK)- MOI 1910 тыс.
7. CMV.OTOF(AK) - MOI 127 тыс.
8. CMV.OTOF(AK)- MOI 382 тыс.
9. Отрицательный

5'OTOF=95D
3'OTOF = 131KD

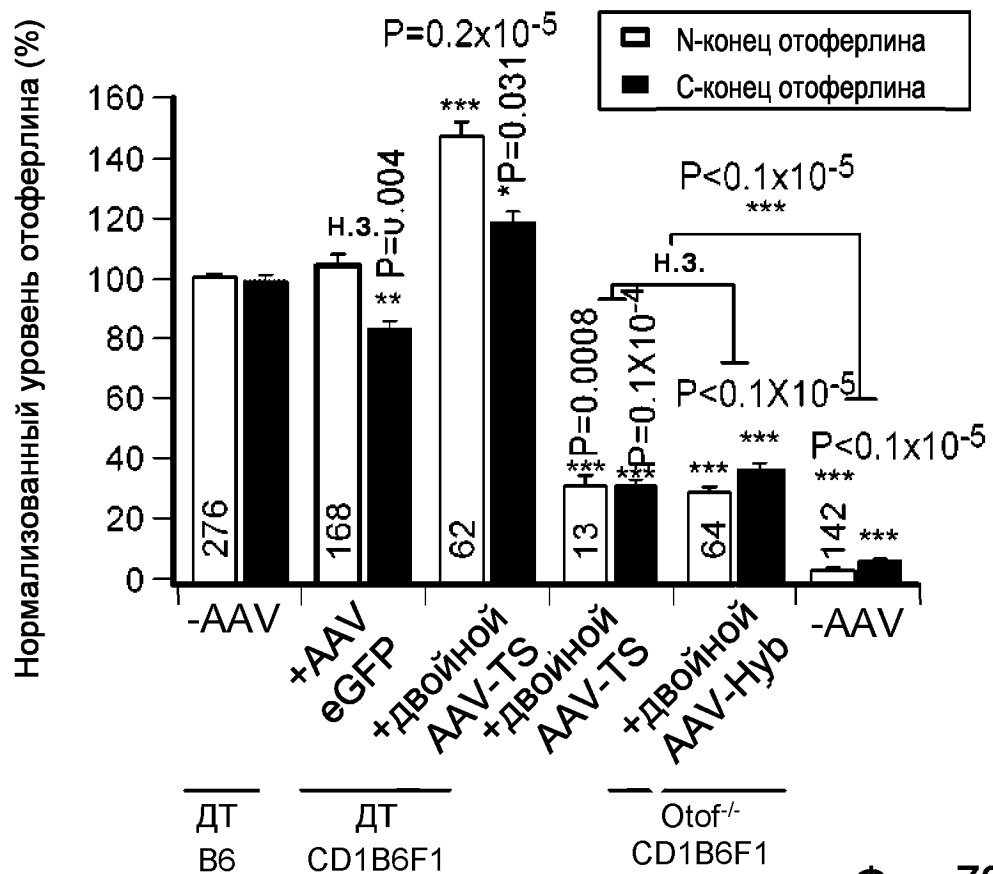
Фиг. 70



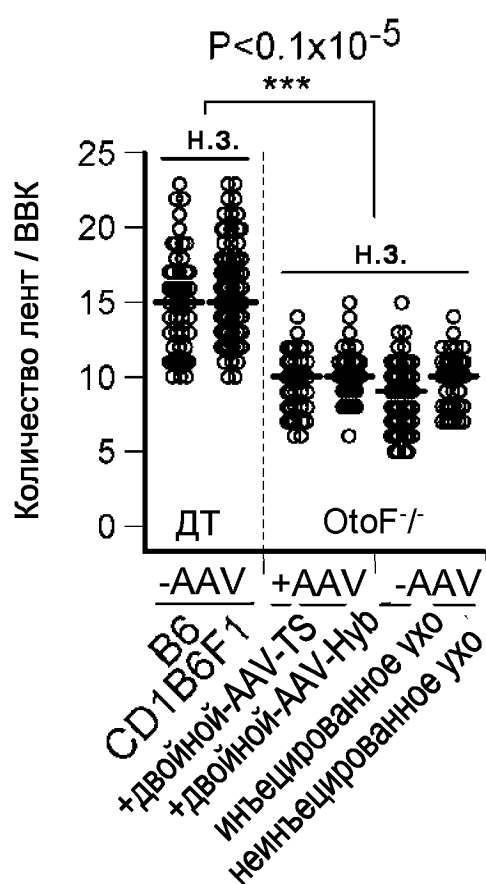
Фиг. 71



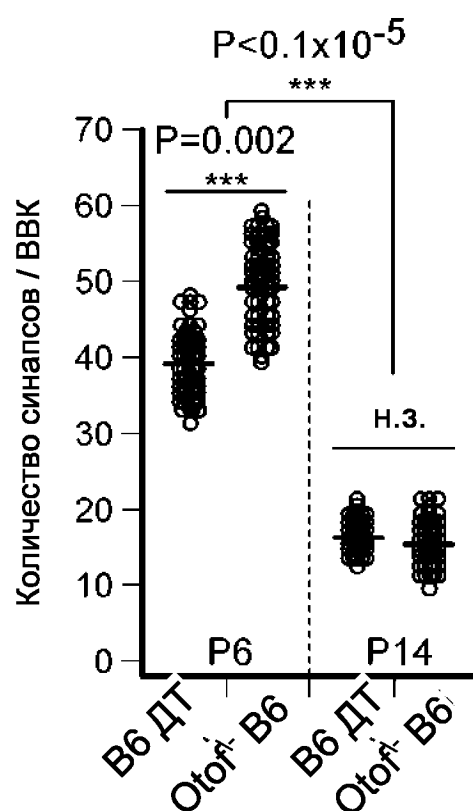
Фиг. 72



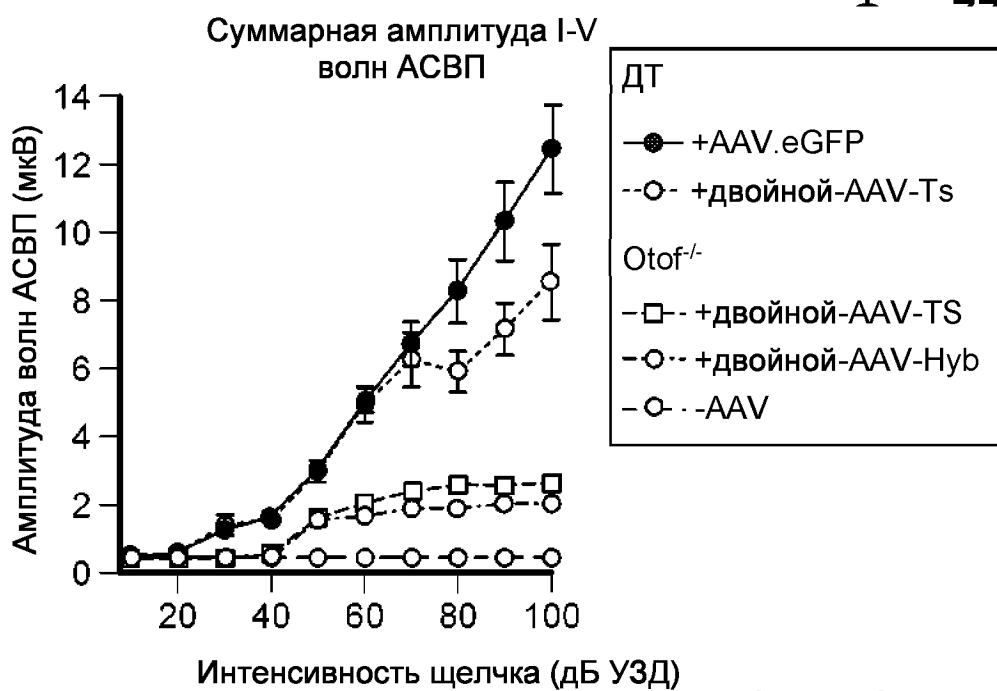
Фиг. 73



Фиг. 74

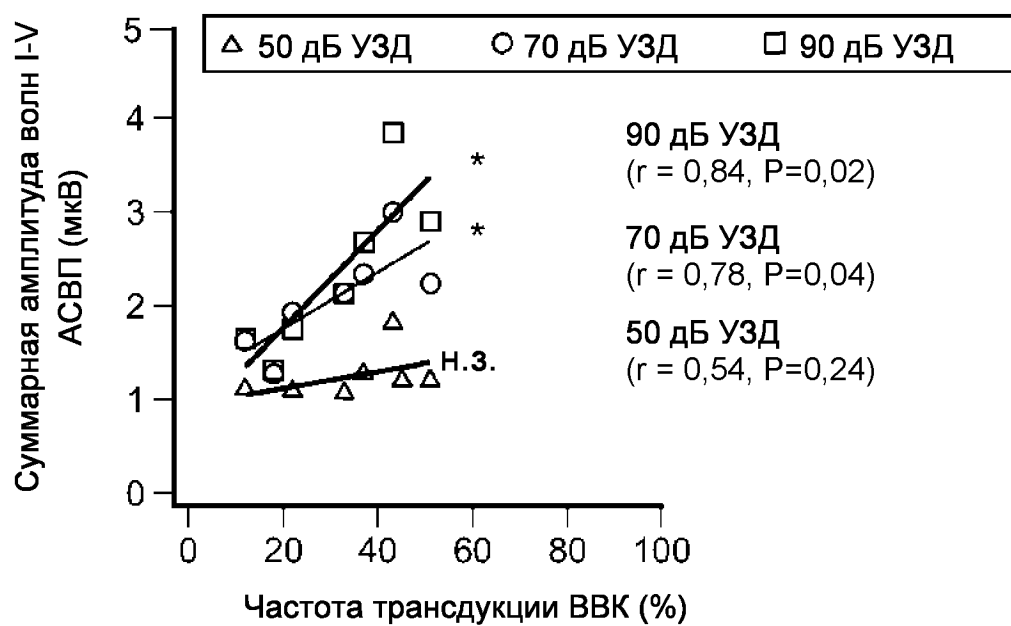


Фиг. 75



Фиг. 76

Otof^{-/-} + двойной-AAV-TS



Фиг. 77