

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291525 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.15

(22) Дата подачи заявки
2020.11.18

(51) Int. Cl. C12N 15/67 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)

(54) ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ ОН-БИПОЛЯРНЫХ КЛЕТОК,
ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ

(31) 19209841.6

(32) 2019.11.18

(33) EP

(86) PCT/EP2020/082588

(87) WO 2021/099420 2021.05.27

(71) Заявитель:
УНИВЕРЗИТЕТ БЕРН (CH)

(72) Изобретатель:
Кляйнлогель Соня, Хуллигер Эльмар
Карлос (CH)

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

(57) Изобретение относится к синтетическим промоторным последовательностям, специфическим в отношении ОН-биполярных клеток сетчатки, и к их применению в терапевтической доставке трансгенов в глаз для улучшения и/или восстановления зрения. Изобретение относится к промоторам гена метаботропного глутаматного рецептора 6 (mGluR6) для повышенной и более специфической экспрессии в ОН-биполярных клетках, в частности в ОН-биполярных клетках макулы человека, представляющих собой колбочки.

A1

202291525

202291525

A1

**ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ ON-БИПОЛЯРНЫХ
КЛЕТОК, ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ**

Настоящее изобретение относится к синтетическим промоторным последовательностям, специфическим в отношении ON-биполярных клеток сетчатки, и к их применению в терапевтической доставке трансгенов в глаз для улучшения и/или восстановления зрения. Настоящее изобретение предусматривает промоторы гена метаботропного глутаматного рецептора 6 (mGluR6) для повышенной и более специфической экспрессии в ON-биполярных клетках. В частности, для эффективной экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки, присутствующих исключительно в макуле человека.

Описание**Предпосылки изобретения**

Многие причины слепоты имеют лишь ограниченные возможности лечения или вообще не лечатся. Наиболее распространенными среди них являются возрастная макулярная дегенерация (AMD) и наследственные заболевания сетчатки (IRD), такие как пигментный ретинит (RP). Эти дегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей потерей фоторецепторов (PR), что в конечном итоге приводит к полной слепоте. Средства генной терапии, доставляющие лечебную ДНК или РНК, заменяющие или подвергающие сайленсингу дефектные гены или кодирующие экзогенный лечебный ген, направлены на замедление прогрессирования заболевания, снижение степени тяжести симптомов или восстановление утраченной функции.

Оптогенетическая генная терапия является одной из наиболее многообещающих новых технологий, которые могут быть использованы для лечения слепоты, вызванной дегенерацией сетчатки. Текущие клинические испытания средств оптогенетической терапии неспецифически нацеливаются на ганглиозные клетки сетчатки (RGC) с канальными родопсинами для восстановления чувствительности сетчатки к свету. В будущем оптогенетические средства генной терапии следующего поколения, адаптированные по отношению к клеткам, докажут свое превосходство над этими неспецифическими средствами терапии. В этих средствах терапии следующего поколения применяются промоторы, специфические в отношении типа клеток, для доставки новых и эффективных оптогенетических инструментов к определенным типам клеток сетчатки. Среди мишеней из типов клеток наиболее многообещающими являются биполярные клетки сетчатки (BC), первые интернейроны сетчатки, которые естественным образом получают прямой входной сигнал от PR. BC делятся на BC ON- и OFF-типа, реагирующие либо на повышение освещенности, либо на снижение освещенности соответственно, и экспрессирующие либо mGluR6, либо AMPA/каинатные глутаматные рецепторы. ON-биполярные клетки (OBC) являются особенно интересными мишенями для генной терапии. Все мутации в специфических генах OBC, таких как NYX, GRM6, GPR179 или

TRPM1, приводят к полной слепоте (врожденной стационарной ночной слепоте), поскольку эти гены участвуют в сигнальном каскаде mGluR6, и, следовательно, ОВС становятся нефункциональными. Совсем недавно было доказано, что экспрессия оптогенетических белков в ОВС восстанавливает зрение у мышей, представляющих собой модели фоторецепторной дегенерации, страдающих от поздних стадий дегенерации. Канальный родопсин-2 (Lagali et al., *Nat Neurosci* 2008. **11**:p. 667-675), родопсин (Cehajic-Kapetanovic et al., *Curr Biol* 2015. **25** : p. 2111-2122) и химерный Opto-mGluR6 (van Wyk et al., *PLoS Biol* 2015. **13**: p. e1002143) были успешно экспрессированы в ОВС слепых мышей и восстановили функциональное зрение на уровнях сетчатки, коры, а также на поведенческом уровне. Для всех вышеупомянутых подходов необходимо специфически нацеливаться на тип ОВС, в частности в случае оптогенетических подходов, чтобы избежать противоречивой передачи сигнала от нецелевых клеток, искажающей код сетчатки. Кроме того, специфическое нацеливание на ОВС также позволяет снизить и таким образом сделать более безопасной дозировку AAV. Отсутствие функционального и ОВС-специфического промотора до сих пор препятствовало клиническому применению средств генной терапии, нацеливающихся на ОВС.

Короткие энхансерные промоторные последовательности обычно использовались в данной области для достижения ОВС-специфического нацеливания в комбинации со средством генной терапии на основе AAV. Это связано с тем, что способность AAV к упаковке ограничена 4,7 т. п. о. и обычно не позволяет вместить эндогенные промоторы длиной несколько т. п. о. В этом отношении наиболее успешными оказались энхансерные промоторные последовательности, полученные из ОВС-специфического глутаматного рецептора mGluR6, экспрессируемого исключительно в ОВС сетчатки. До недавнего времени стандартно использовали энхансерную последовательность длиной 200 п. о., полученную из мышинового гена *Grm6*, и в комбинации с вирусным основным промотором SV40 (Kim et al. *J Neurosci*, 2008. **28**: p. 7748-7764.), сокращенно обозначенную 200En-SV40. Однако недавно авторы настоящего изобретения показали, что ее вариант, 4×200En-SV40, который несет четыре повтора энхансерной последовательности (Cronin et al. *EMBO Mol Med* 2014. **6**: p. 1175-1190), не является ни ОВС-специфическим, ни функциональным при дегенерации сетчатки поздней стадии (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. **11**: p. 161). Совсем недавно был сконструирован короткий энхансер/промотор на основе полноразмерного мышинового гена *Grm6* (200En-mGluR500P), который экспрессируется в сетчатке мышей C57BL/6 дикого типа с относительно хорошей специфичностью в отношении ОВС (Lu et al. *Gene Ther*, 2016. **23**: p. 680-9.). Тем не менее, экспрессия в ОВС дегенерирующей сетчатки не была показана, и экспрессия была практически исключительно обусловлена ОВС типа палочек. Следовательно, ОВС типа колбочек, обнаруженные исключительно в макуле сетчатки фовеальных животных, включая человека, и соединяющиеся с фовеальными колбочками, опосредующими цветовое зрение высокой остроты, практически не являются мишенями для 200En-mGluR500P, что делает данный промотор непригодным для восстановления центрального

зрения человека высокой остроты. Кроме того, предпочтителен промотор на основе человеческого гена GRM6, поскольку он будет полностью контролироваться транскриптомным механизмом человека, регулирующим экспрессию генов, т. е. экспрессию уровней белков, опосредующих функцию, но будет лишен индукции цитотоксичности.

Основываясь на вышеупомянутом уровне техники, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы обеспечить средства и способы получения новых синтетических ОВС-специфических человеческих промоторов. Данная цель достигается с помощью объекта изобретения согласно независимым пунктам формулы настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащей:

- а. элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- б. элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащей:

а. элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше), в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

б. элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Второй аспект настоящего изобретения относится к вектору экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Третий аспект настоящего изобретения относится к трансгену, управляемому

промотором.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вирионной частице аденоассоциированного вируса, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту или трансген согласно третьему аспекту.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, для применения в качестве лекарственного препарата.

Формы для введения, содержащие средства по настоящему изобретению, являются дополнительными аспектами настоящего изобретения.

Термины и определения

Термин OBC в контексте настоящего описания относится к ON-биполярной клетке.

Термин RBC в контексте настоящего описания относится к биполярной клетке, представляющей собой палочку.

Термин sOBC в контексте настоящего описания относится к ON-биполярной клетке, представляющей собой колбочку.

Термин RGC в контексте настоящего описания относится к ганглиозной клетке сетчатки.

Термин PR в контексте настоящего описания относится к фоторецептору.

Аббревиатура AAV в контексте настоящего описания относится к аденоассоциированному вирусу. Если не указано иное, AAV относится ко всем подтипам или серотипам, а также к обоим из способных к репликации и рекомбинантных форм.

Термины *вирион AAV* и *вирусная частица AAV* в контексте настоящего описания относятся к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсулированной нуклеиновой кислоты.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники (например, в культивировании клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, методиках гибридизации и биохимии). Стандартные методики используются для молекулярных, генетических и биохимических способов (см. в общем Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.), а также химических способов.

Термин *капсид AAV* в контексте настоящего описания относится к синтетическим генам, кодирующим капсидные белки (cap). Описанный в данном документе термин *капсид AAV* можно использовать в отношении упаковки в рекомбинантные аденоассоциированные вирусы для генной терапии.

Термин "*гомологичный*" в контексте настоящего описания относится к последовательностям, большая часть которых является идентичной, но отличается в некоторых положениях наличием вставки, делеции или замены нуклеиновых кислот или аминокислот.

Термин "*трансген*" в контексте настоящего описания относится к гену или генетическому материалу, который был перенесен из одного организма в другой. В контексте настоящего изобретения данный термин также может относиться к переносу природного или физиологически интактного варианта генетической последовательности в ткань пациента, где она отсутствует. Это может дополнительно относиться к переносу природной кодированной последовательности, экспрессия которой управляется промотором, отсутствующим или подвергнутому сайленсингу в целевой ткани. Используемый в данном документе термин "*трансген*" относится к полинуклеотиду, кодирующему представляющий интерес полипептид, который при экспрессии в поврежденной или пораженной заболеванием сетчатке может быть пригоден для улучшения или восстановления зрения. Трансгены, представляющие особый интерес для восстановления светочувствительности или зрения, предусматривают светочувствительные белки, такие как гены опсинов, т. е. канальных родопсинов, опсинов позвоночных и их вариантов.

Термин "*рекомбинантный*" в контексте настоящего описания относится к нуклеиновой кислоте, которая является продуктом одной или нескольких стадий клонирования, рестрикции и/или лигирования и которая отличается от встречающейся в природе нуклеиновой кислоты. Рекомбинантная вирусная частица содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту.

Термин "*интравитреальное введение*" в контексте настоящего описания относится к пути введения фармацевтического средства, например, вируса, при котором средство доставляется в стекловидное тело глаза. Интравитреальное введение представляет собой процедуру помещения лекарственного препарата непосредственно в пространство в задней части глаза, называемое полостью стекловидного тела, которая заполнена желеобразной жидкостью, называемой гелем стекловидного тела.

Термин "*субретинальное введение*" в контексте настоящего описания относится к пути введения фармацевтического средства, в частности вируса в контексте данного описания, в пространство между клетками пигментного эпителия сетчатки (RPE) и фоторецепторами.

"Нуклеотиды" в контексте настоящего описания представляют собой строительные блоки нуклеиновой кислоты или аналогов нуклеиновой кислоты, олигомеры которых способны к образованию селективных гибридов с олигомерами РНК или ДНК на основе спаривания оснований. Термин "нуклеотиды" в данном контексте включает классические строительные блоки рибонуклеотидов, представляющие собой аденозин, гуанозин, уридин (и рибозилтимин), цитидин, классические дезоксирибонуклеотиды, представляющие собой дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, тимидин, дезоксиуридин и

дезоксицитидин.

В контексте настоящего описания термины *идентичность последовательностей* и *"процент идентичности последовательностей"* относятся к значениям, определенным посредством сравнения двух выровненных последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны из уровня техники. Выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита и Уотермана, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма глобального выравнивания Нидлмана и Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), способа поиска сходства Пирсона и Липмана, Proc. Nat. Acad. Sci. 85:2444 (1988) или посредством реализаций этих алгоритмов с помощью компьютера, включая без ограничения CLUSTAL, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным, например, через Национальный центр биотехнологической информации (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Одним таким примером сравнения последовательностей нуклеиновых кислот является алгоритм BLASTN, использующий настройки по умолчанию: ожидаемый порог: 10; размер слова: 28; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; баллы за совпадение/несовпадение: 1.-2; стоимость гэпов: линейная. Если не указано иное, приведенные в данном документе значения идентичности последовательностей относятся к значениям, полученным с применением пакета программ BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) с применением идентифицированных выше установленных по умолчанию параметров для сравнения белков и нуклеиновых кислот соответственно.

В контексте настоящего описания термин *"расположенный выше"* относится к направлению к 5'-концу. Для энхансерных и промоторных последовательностей в данной заявке приведены одноцепочечные последовательности, и если энхансер расположен выше промотора, это означает, что энхансер расположен в 5'-направлении от промотора. Аналогично, термин *"расположенный ниже"* относится к направлению к 3'-концу.

В контексте настоящего описания термин *"спейсерная последовательность"* относится к нуклеиновой кислоте переменной длины, которая используется для соединения энхансера и промотора с целью получения одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Иллюстративными вариантами осуществления линкеров, пригодных для реализации настоящего изобретения на практике, являются цепи олигонуклеиновой кислоты, состоящие из 1-1000 нуклеиновых кислот.

Специфичность в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки (сОБС), в эксплантатах сетчатки человека измеряется с применением следующего протокола.

Во-первых, промотор объединяется с репортерным трансгеном mCitrine и упаковывается в самокомплементарный (sc) вектор scAAV2(7m8) на основе AAV (Dalkara et al. Sci Transl Med 2013. **5**: p. 189a76). Примерно 10^{10} vg (векторных геномов) добавляют к стороне RGC культивируемых посмертных эксплантатов сетчатки человека в день 0, как

подробно описано в (van Wyk et al. Front Neurosci 2017. **11**: p.161). Сетчатки фиксируются в день 7 культивирования с помощью 4% PFA и затем подвергаются криозащите (10/20/30% сахарозы в PBS) и замораживаются. Криосрезы сетчатки три раза обрабатываются антителами к трансгену mCitrine (Invitrogen, A11122, 1:500), антителами к повсеместно встречающемуся маркеру OBC Gao (EMD, MAB3073, 1:750) и специфическим в отношении RBC антителом к PKC α (Santa Cruz, sc8393, 1:750). Экспрессирующие RBC идентифицируются как [mCitrine(+), PKC α (+)], тогда как клетки [mCitrine(+), PKC α (-), Gao(+)] идентифицируются как экспрессирующие cOBC. Специфичность типа cOBC определяется по соотношению экспрессирующих cOBC и всех экспрессирующих OBC:

$$\left[\frac{N\{mCitrine(+), PKC\alpha(-), Gao(+)\}}{N\{mCitrine(+), Gao(+)\}} \right] (1),$$

где N представляет собой количество клеток с характеристиками окрашивания, указанными в скобках.

Предпочтительность в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, затем определяется следующим образом.

Количество RBC и cOBC неодинаково и варьируется в разных областях сетчатки. Эксплантаты получают из средней части и периферии сетчатки, где соотношение RBC и cOBC

$$\left[\frac{N\{PKC\alpha(+)\}}{N\{PKC\alpha(-), Gao(+)\}} \right] (3)$$

является примерно постоянным на небольшом участке эксплантата. Следовательно, соотношение экспрессирующих cOBC и экспрессирующих RBC

$$\left[\frac{N\{mCitrine(+), PKC\alpha(-), Gao(+)\}}{N\{mCitrine(+), PKC\alpha(+), Gao(+)\}} \right] (4)$$

можно считать постоянным и в эксплантате. Это позволяет рассчитать коэффициент предпочтительности cOBC по сравнению с RBC

$$x = \frac{N\{PKC\alpha(+)\} * N\{mCitrine(+), PKC\alpha(-), Gao(+)\}}{N\{PKC\alpha(-), Gao(+)\} * N\{mCitrine(+), PKC\alpha(+), Gao(+)\}} (5),$$

что позволяет определить специфическое распределение cOBC и RBC в эксплантате посредством умножения (3) на (4). Затем предпочтительность cOBC в процентах рассчитывается с помощью

$$\frac{100\% * x}{1+x} (6)$$

Используемый в данном документе термин "осуществление лечения" или "лечение" любого заболевания или нарушения (например, потери зрения) относится в одном варианте осуществления к снижению степени тяжести заболевания или нарушения (например, к замедлению, или остановке, или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относятся к облегчению или снижению степени тяжести по меньшей мере одного физического параметра, включая параметры, которые могут быть неявными для пациента. В еще одном варианте осуществления

"осуществление лечения" или "лечение" относятся к модулированию заболевания или нарушения либо физически (например, стабилизации явного симптома), либо физиологически (например, стабилизации физического параметра), либо к им обоим. В еще одном варианте осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относятся к введению экзогенной терапевтической функции в клетки определенного типа. Способы оценки лечения и/или предупреждения заболевания, как правило, известны из уровня техники, если только они специально не описаны в данном документе ниже.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении раскрыты энхансерные промоторные последовательности человеческого гена GRM6 с повышенной специфичностью в отношении OBC и значительно усиленной индуцируемой в cOBC экспрессией белка по сравнению с 200Ep-mGluR500P в посмертной сетчатке мыши и человека. Промоторы, описанные в данном документе, состоят из промотора гена модифицированного метаботропного глутаматного рецептора 6 (mGluR6), который содержит последовательности из регуляторных элементов, которые направляют экспрессию белка mGluR6 в OBC, в частности RBC и cOBC. Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или вектору экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащим энхансер гена mGluR6 или его вариант и промотор гена mGluR6 или его вариант. Эта новая энхансерная промоторная последовательность из гена GRM6 впервые обеспечивает эффективную экспрессию трансгена в cOBC сетчатки человека, в частности в парафовеа человека. Кроме того, новые энхансерные промоторные последовательности из человеческого гена GRM6 в комбинации с оптогеном (MWOPN_mGluR6, SEQ ID NO: 16) приводили к широкому распространению OBC-специфической экспрессии в дегенерирующей мышью (rd1, C3HHe/OuJ) сетчатке и восстановлению функционального зрения (оптомоторный ответ) у в ином случае слепых мышей с дегенерацией фоторецепторов. Новый энхансер/промотор человеческого гена GRM6 продемонстрировал высокоэффективное, обширное и специфическое нацеливание на OBC в сетчатке мыши и человека.

Первый аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей:

- a. элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- b. элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащей:

- a. элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Другая альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей:

- a. элемент энхансерной последовательности, который на 70% или больше, в

частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b. элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Другая альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащей:

a. элемент энхансерной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b. элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Специфичность в отношении сОВС и уровень экспрессии в сОВС измеряются, как описано выше.

Авторы настоящего изобретения показали, что комбинация SEQ ID NO 1 или 2 с SEQ ID NO 7 приводит к высокой специфичности в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, и к высокому уровню экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки. Специалист в данной области техники способен найти сходные последовательности с эквивалентной специфичностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, и уровнем экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки, на основе раскрытия настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления элемент энхансерной последовательности расположен выше элемента промоторной последовательности.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит спейсерную последовательность длиной 1-1000 пар оснований, в частности 1-394 пар оснований. В определенных вариантах осуществления спейсер расположен между энхансером и промотором. В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит спейсерную последовательность длиной 1-1000 пар оснований, в частности 1-394 пар оснований, и спейсер расположен между энхансером и промотором.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13.

Второй аспект настоящего изобретения относится к вектору экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный геном.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV).

В определенных вариантах осуществления вектор на основе AAV представляет собой либо одноцепочечный вектор (ssAAV), либо самокомплементарный вектор (scAAV).

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:

- а. последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- б. трансен.

От 5'-конца к 3'-концу выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит в первую очередь энхансер, затем необязательно спейсер и затем промотор. Трансен расположен в 3'-направлении от промотора. В определенных вариантах осуществления трансену предшествует оптимизированная последовательность КОЗАК.

Последовательность Козак содержит консенсус (gcc)gccAccAUGG (SEQ ID NO 24) или (gcc)gccGccAUGG (SEQ ID NO 25) и важна для инициации трансляции.

В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит регуляторную последовательность WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков). WPRE представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции создает третичную структуру, усиливающую экспрессию. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит поли(А)-хвост, встроенный ниже трансгена. Поли(А)-хвост способствует трансляции трансгена.

В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой AAV2, AAV2(7m8) или AAV8(BP2).

Третий аспект настоящего изобретения относится к трансену, управляемому промотором.

В определенных вариантах осуществления трансен представляет собой NYX, GRM6, GPR179 или TRPM1 для восстановления светочувствительности или зрения при врожденной стационарной ночной слепоте.

В определенных вариантах осуществления трансен содержит последовательность под SEQ ID NO 16 или существенным образом состоит из нее.

В определенных вариантах осуществления трансен представляет собой ген опсина, восстанавливающий восприятие света или зрение.

В определенных вариантах осуществления ген опсина выбран из группы, состоящей из канального родопсина, меланопсина, родопсина, опсинов колбочек, пинеального опсина, фотопсинов, галородопсина, бактериородопсина, протеородопсина, опсина медузы, опсина паука-скакуна или любого их функционального варианта или фрагмента.

В определенных вариантах осуществления ген опсина представляет собой химерный белок, полученный из опсина и метаботропного глутаматного рецептора mGluR6 из ОВС сетчатки.

В определенных вариантах осуществления химерный белок представляет собой Opto-mGluR6.

В определенных вариантах осуществления химерный белок представляет собой мышинный или человеческий MWOPN_mGluR6 (SEQ ID NO: 16).

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вирионной частице аденоассоциированного вируса, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты

согласно первому аспекту или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно третьему и четвертому аспектам, для применения в качестве лекарственного препарата.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту для применения в лечении состояния, поражающего биполярную клетку сетчатки.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, для применения в лечении врожденной стационарной ночной слепоты или палочко-колбочковых и колбочко-палочковой дистрофий, в частности пигментного ретинита и макулярной дегенерации.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, где средство вводится посредством:

- a. интравитреального введения, в частности посредством интравитреальной инъекции, или посредством
- b. субретинальной инъекции.

Дополнительный аспект относится к способу лечения, при котором средство по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом пациенту.

Там, где альтернативы отдельных разделяемых признаков, таких как, например, промоторная последовательность или медицинское показание, представлены в данном документе как "варианты осуществления", следует понимать, что такие альтернативы можно свободно комбинировать для получения отдельных вариантов осуществления раскрытого в данном документе настоящего изобретения. Таким образом, любой из альтернативных вариантов осуществления промоторной последовательности можно комбинировать с любым медицинским показанием, подвергающим риску функцию ОВС, и любой средой-носителем для доставки ДНК или способом доставки ДНК, включая альтернативные вирусы, наночастицы, липосомы или доставку "голой" ДНК с применением, например, генной пушки или электропорации.

Неограничивающий перечень заболеваний сетчатки, при которых могут принести

пользу описанные в данном документе способы, включает врожденную ночную слепоту, макулярную дегенерацию, возрастную макулярную дегенерацию, врожденные колбочковые дистрофии и большую группу нарушений, связанных с пигментным ретинитом (RP).

Абзацы

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащая:

- a. элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- b. элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащая:

a. элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше), в частности на 75% или больше, на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b. элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно абзацу 1 или абзацу 2, где выделенная молекула состоит из одного и только одного из указанных элементов энхансерной последовательности, одного и только одного из указанных элементов промоторной последовательности и необязательно спейсера, отделяющего элемент энхансерной последовательности от элемента промоторной последовательности.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих абзацев, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15, или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15, или состоящая из нее.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих абзацев, содержащая последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 11 или SEQ ID NO 13, или состоящая из нее, в частности содержащая последовательность под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 13, или состоящая из нее.

6. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих абзацев.

7. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно абзацу 6, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV), в частности где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12, более конкретно где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

8. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-7, дополнительно содержащий:

- a. последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- b. трансген.

9. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно абзацу 8, где трансген содержит последовательность под SEQ ID NO 16.

10. Вирионная частица аденоассоциированного вируса, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5 или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9.

11. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5 или вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10, для применения в качестве лекарственного препарата.

12. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10 для применения в лечении состояния, поражающего биполярную клетку сетчатки, в частности в лечении врожденной стационарной ночной слепоты (CSBN1) или палочко-колбочковой и колбочко-палочковой дистрофий, более конкретно пигментного ретинита и макулярной дегенерации.

13. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10, где

средство вводится посредством:

- а. интравитреального введения, в частности посредством интравитреальной инъекции, или посредством
- б. субретиальной инъекции.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и графическими материалами, из которых можно извлечь дополнительные варианты осуществления и преимущества. Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, но не для ограничения его объема.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Вид последовательностей человеческого гена GRM6, выбранных для конструирования промотора, в геномном браузере. (А) Дистальная энхансерная область гена GRM6 человека (расположена на расстоянии примерно -14 т. п. о. относительно сайта начала трансляции (TLSS)), указывающая на три выбранных энхансерных элемента, включая консервативную область размером 310 п. о. между мышинным геном Grm6 и человеческим геном GRM6 (заштрихована горизонтальными линиями), а также синтетическая область размером 188 п. о., соответствующая участку 200En(Grm6) в мышинной модели согласно Kim (часть, которая заштрихована горизонтальными линиями и затемнена). (В) Промоторная последовательность человеческого гена GRM6, включая сайт начала транскрипции (TSS) и сайт начала трансляции (TLSS), последний определен авторами настоящего изобретения как положение 0. Два выбранных промотора также указаны, и консервативная область размером 167 п. о. между мышинным и человеческим генами показана в виде части, заштрихованной горизонтальными линиями. Графики были загружены из геномного браузера UCSC по адресу <https://genome.ucsc.edu/> и изменены. Отрезки, показанные серым цветом, иллюстрируют потенциально важные цис-регуляторные области, включая сайты связывания факторов транскрипции, межвидовые консервативные области (области, консервативные у позвоночных) и кластеры с гиперчувствительностью к ДНКазе (кластеры с сайтами распознавания ДНКазы). Кроме того, также рассматривались сигнальный пик метки H3K27Ac и пики ChIP-seq.

Фиг. 2. Интенсивность экспрессии mCitrine, управляемой промотором, в ОВС из посмертных эксплантатов сетчатки человека. Эксплантаты сетчатки человека трансдуцировали с помощью scAAV2(7m8)-407En_566P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3), scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3), scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 5), scAAV2(7m8)-407En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3) и scAAV(7m8)-200En-mGluR500P-mCitrine (n равняется 4). mCitrine был иммуногистохимически помечен, и интенсивность флуоресценции в экспрессирующих ON-биполярных клетках определяли как меру интенсивности экспрессии трансгена. Промоторный элемент 566P опосредовал гораздо более слабую экспрессию mCitrine в ОВС по сравнению с комбинациями промоторов с проксимальным элементом 454P. Поэтому для всех последующих экспериментов был выбран 454P.

770En_454P(hGRM6) (F равняется $5,42 \pm 0,9$; среднее значение $\pm$ s. d.) и 444En_454P(hGRM6) (F равняется $5,59 \pm 0,51$; среднее значение $\pm$ s. d.) проявляли одинаковую эффективность в отношении интенсивности экспрессии трансгена и значительно более высокую эффективность, чем 200En-mGluR500P, полученный из мышинового генома (F равняется $3,94 \pm 0,45$; среднее значение $\pm$ s. d.). * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, *** означает, что P равняется 0,001 или меньше, и n. s. означает незначимые различия (однофакторный ANOVA с критерием значимости Тьюки).

Фиг. 3. Специфичность промотора в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки (сОBC), в эксплантатах сетчатки человека. Эксплантаты сетчатки человека трансдуцировали с помощью scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine, scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine, scAAV2(7m8)-407En_454P(hGRM6)-mCitrine или scAAV(7m8)-200En-mGluR500P-mCitrine. Вертикальные криосрезы метили антителом к mCitrine, PKC α (для биполярных клеток, представляющих собой палочки (RBC) и антителом к G α 0 (повсеместно встречающемуся маркеру ОBC) и осуществляли подсчет клеток, экспрессирующих mCitrine. (A) Исходя из подсчета клеток, 770En_454P(hGRM6) вызывал экспрессию в значительно большем количестве сОBC, чем 200En-mGluR500P. (B) Нормализация количества целевых сОBC и RBC к их общему количеству в пределах определенных областей сетчатки, в которых были проведены подсчеты, демонстрирует, что 770En_454P(hGRM6) и 407En_454P(hGRM6) намного более эффективно управляют экспрессией в сОBC, чем 200En-mGluR500P, который характеризуется явной предпочтительностью в отношении RBC. 770En_454P(hGRM6) даже демонстрирует одинаковую предпочтительность в отношении сОBC и RBC, составляющую 50% для каждой из них, что является важным отличительным признаком фовеального средства генной терапии, где существуют только сОBC. (C) Предпочтительность промотора 444En_454P(hGRM6) в отношении типа сОBC (n равняется 5) существенно не отличалась от предпочтительности промотора 770En_454P(hGRM6). Показаны средние значения $\pm$ s. d., * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше (однофакторный ANOVA с критерием значимости Тьюки). Указаны только значимые различия.

Фиг. 4. Эффективность и специфичность экспрессии mCitrine в ОBC, управляемой с помощью 770En_454P(hGRM6), в эксплантатах сетчатки человека (A) Сравнение экспрессии mCitrine, управляемой с помощью 770En_454P(hGRM6), с экспрессией mCitrine, управляемой с помощью 200En-mGluR500P, при упаковке в scAAV2(7m8). 770En_454P(hGRM6) демонстрирует гораздо более высокую предпочтительность в отношении ОBC по сравнению с 200En-mGluR500P, и последний, кроме того, характеризуется значительно более высокой нецелевой экспрессией в амакриновых клетках. Показаны % экспрессирующих клеток определенного типа клеток в виде средних значений $\pm$ s. d., ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и ***

означает, что P равняется 0,001 или меньше (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 5. Промотор 770En_454P(hGRM6) надежно и широко управляет экспрессией трансгена в дегенерирующей сетчатке мыши rd1. Мышам rd1 путем инъекции вводили 3×10^9 vg AAV, несущего трансген MWOPN_mGluR6_IRES2_TurboFP635 (SEQ ID NO: 16, плазмидная карта (фиг. 9), в возрасте 22 недель. На схемах A-D серым цветом представлены трансдуцированные участки сетчатки в тотальных препаратах сетчатки. А) ssAAV2(7m8) в комбинации с 200En-mGluR500P также экспрессируется в сетчатке rd1, но только в ограниченных участках (в отличие от 4xGrm6-SV40). В) ssAAV(7m8) в комбинации с 770En_454P(hGRM6) приводит к более обширной и распространенной трансдукции дегенерирующей сетчатки по сравнению с 200En-mGluR500P, вероятно вследствие повышенной интенсивности экспрессии, которая преодолевает порог экспрессии, если имеет место подавление Grm6, вызванное дегенерацией. С) Пример микрофотографии тотального препарата обработанной сетчатки мыши rd1, подвергающейся ОКР-тестированию, полученной посредством лазерной сканирующей микроскопии (см. пример 7 и фиг. 6), где TurboFP635 был помечен иммуоцитохимически (изображено на схеме В). (D) Средняя специфичность (% экспрессирующих ОВС от всех экспрессирующих клеток, $66,6 \pm 8,5\%$) и эффективность экспрессии (% экспрессирующих ОВС от всех ОВС, $54,7 \pm 8,3$) в дегенерирующей сетчатке rd1. Среднее значение $\pm$ s. d., N равняется 9 (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 6. Восстановление зрения, определенное по оптомоторному рефлексу, у мышей rd1 с полным отсутствием фоторецепторов, которые были интравитреально и билатерально обработаны с помощью ssAAV(7m8)-MWOPN_mGluR6_IRES2_TurboFP635 в возрасте 22 недель. Остроту зрения измеряли через 41, 47, 55, 82 и 112 дней после трансдукции посредством определения порога пространственных частот, при котором оптокинетический ответ все еще вызывался в виртуальной оптомоторной системе. Обработанные мыши (N равняется 3) продемонстрировали значительное повышение остроты зрения по сравнению с контрольными одноплетниками rd1, которым не вводили вектор (N равняется 7), но все еще характеризовались значительно более низкой остротой зрения, чем контрольные мыши дикого типа (C57BL/6J, N равняется 10). Показано среднее значение (по всем испытаниям и особям) $\pm$ s. d., ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и *** означает, что P равняется 0,001 или меньше (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 7. Высокоэффективная экспрессия mCitrine в cOBC эксплантированной макулы человека под контролем промотора 770En_454P(hGRM6). Пример эксплантата макулы человека, трансдуцированного с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine и иммуогистохимически помеченного антителом к трансгену mCitrine, а также антителом к ОВС (Gao) и красителем, окрашивающим ядра клеток (DAPI). (A) представляет собой схему макулы человека и участков, где были сделаны микрофотографии, изображенные на фигурах В и С. Фовеола содержит только

фоторецепторы М- и L-колбочек и не содержит ни ОВС, ни RGC, поскольку их клеточные тела вытеснены в сторону, чтобы свет мог проходить без дифракции к фоторецепторам. Фовеа содержит только колбочки (М, L и S) и является участком наибольшей остроты зрения с системой карликовых клеток, где каждая колбочка соединяется с одной ВРС и одной RGC. На фигуре (В) показан срез через парафовеа с DAPI (верхняя микрофотография), демонстрирующий четкое наложение фоторецепторов (ONL), ВРС и амакриновых клеток (INL), а также 3-мерное наложение RGC (GCL), указывающее на макулу. На нижней микрофотографии показано только мечение с применением трансгена, указывающее на экспрессию mCitrine исключительно в INL, где расположены ОВС. На фигуре (С) показан срез через фовеа. На микрофотографии слева показано только мечение Gao в клетках ОВС, все из которых не помечены антителом к РКС (не показано) и поэтому четко идентифицируются как сОВС. На правой микрофотографии дополнительно изображено мечение с помощью mCitrine в цитоплазме, что указывает на то, что практически каждая сОВС из фовеа экспрессирует mCitrine (показано стрелками). Это очень четкое доказательство того, что 770En_454P(hGRM6) обеспечивает превосходную экспрессию в сОВС, в частности в сОВС макулы человека, и, следовательно, хорошо подходит для восстановления остроты зрения у пациентов-людей.

Фиг. 8. Плазмидная карта плазмиды AAV, кодирующей опсин колбочек и химерный оптогенетический белок mGluR6, MWOPN_mGluR6-IRES2-TurboFP635, под контролем нового промотора 770En_454P(hGRM6). TurboFP635 представляет собой маркер, представляющий собой красный флуоресцентный белок, для идентификации экспрессии, WPRE и BGHrA представляют собой регуляторные последовательности, и 5'- и 3'-ITR (внутренние повторы) представляют собой области, используемые AAV для упаковки трансгена (между ITR) в капсид. Данную плазмиду использовали для трансдукции дегенерирующих сетчаток мышей rd1 (фигуры и примеры 5 и 6). Также приведены праймеры для слияния для клонирования.

Фиг. 9 Пример специфичности экспрессии в ОВС и эффективности 770En_454P(hGRM6) и 444En_454P(hGRM6), управляющих экспрессией mCitrine в эксплантатах сетчатки человека. Вертикальные криосрезы через эксплантаты сетчатки человека, трансдуцированные с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine (А) и scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine (В) соответственно. Криосрезы были помечены ядерным красителем DAPI (серый цвет, показан только в дальнем левом углу микрофотографий для ориентации) и маркером, представляющим собой трансген mCitrine (белый цвет). 770En_454P(hGRM6) характеризуется эффективностью в отношении ОВС (процент светлых клеток в INL), составляющей $85,2\% \pm 12,3\%$ (n равняется 4), и 444En_454P(hGRM6) характеризуется эффективностью, составляющей $87,9\% \pm 6,5\%$ (n равняется 5). ONL: наружный ядерный слой, INL: внутренний ядерный слой, GCL: слой ганглиозных клеток. Биполярные клетки расположены на периферии INL.

Примеры

Пример 1. Анализ изменений экспрессии гена Grm6 в мышинной модели rd1

Авторы настоящего изобретения выбрали ген (*Grm6* у мыши и *GRM6* у человека), кодирующий метаботропный глутаматный рецептор 6 (*mGluR6*), селективно экспрессируемый в ON-биполярных клетках (ОБС) сетчатки, в качестве матрицы для конструирования промотора. Это произошло потому, что экспрессия *mGluR6* является селективной в отношении ОБС, что недавно было подтверждено посредством транскриптомных анализов одной клетки сетчатки взрослой мыши (Siegert et al. *Nat Neurosci* 2012. **15**: p. 487-95), и также явно проявляется в линии трансгенных мышей, ранее созданной авторами настоящего изобретения, где полноразмерный промотор гена *Grm6* управляет экспрессией трансгена, в частности в ОБС сетчатки (van Wyk et al., *PLoS Biol* 2015. **13**: p. e1002143). Кроме того, были успешно сконструированы короткие варианты промотора, полученные из мышинового гена *Grm6*, и было показано, что они обеспечивают предпочтительную экспрессию в ОБС (Cronin et al., *EMBO Mol Med*, 2014. 6(9): p. 1175-1190; Kim et al. *J Neurosci* 2008. 28: p. 7748-7764; Lagali et al. *Nat Neurosci* 2008. 11 p: 667-675). Kim et al. первоначально выбрали дистальную энхансерную последовательность размером 200 п. о. в промоторе мышинового гена *Grm6*, которая усиливала ОБС-специфическую экспрессию в сетчатке мышей дикого типа. Эта энхансерная последовательность впоследствии использовалась в промоторе 4xGRM6-SV40 [Cronin, T., et al., *EMBO Mol Med*, 2014. 6(9): p. 1175-1190], который содержит четыре эти энхансерные последовательности размером 200 п. о. в tandem. Однако недавно авторы настоящего изобретения показали, что промотор 4xGRM6-SV40 [Cronin, T., et al., *EMBO Mol Med*, 2014. 6(9): p. 1175-1190] был полностью подавлен в дегенерирующей сетчатке мыши *rd1* (C3H/HeOu), даже когда генная терапия проводилась в возрасте 3,5 недель до полной дегенерации фоторецепторов (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. **11**: p. 161). Это делает 4xGRM6-SV40 (и в равной степени GRM6-SV40) непригодным для лечения дегенерирующей сетчатки. Кроме того, базальный вирусный промотор SV40 сталкивается с такими проблемами, как сайленсинг при постоянной активации и сверхэкспрессия белка, приводящая к клеточной цитотоксичности. Чтобы сконструировать более подходящие ОБС-специфические промоторы, авторы настоящего изобретения сначала исследовали, остается ли экспрессия *Grm6* повышенной в ходе процесса дегенерации в мышинной модели дегенерации *rd1*. Авторы настоящего изобретения использовали мышиную модель *rd1* на том основании, что промоторы, активные в данной модели тяжелой и быстрой дегенерации, вероятно, будут активны при большинстве менее тяжелых дегенеративных заболеваний сетчатки. Ранее это было продемонстрировано авторами настоящего изобретения, сравнивающими экспрессию трансгена в мышинной модели *rd10* с более медленной дегенерацией (B6.CXB1-Pde6brd10), где 4xGRM6-SV40 все еще был способен управлять некоторой экспрессией [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. **11**(161): p. 161.]. Авторы настоящего изобретения проводили количественную оценку экспрессии гена *Grm6* в сетчатках мышей *rd1* посредством количественной ПЦР в режиме реального времени во временных точках P14, P21, P28 и P54 и сравнивали уровни экспрессии с уровнями экспрессии в сетчатках мышей C57BL/6J

дикого типа. Для нормализации уровней экспрессии использовали экспрессию рибосомного белка L8 (Rpl8). Экспрессия Grm6 оставалась постоянной в ходе дегенерации (P равняется 0,8795), за исключением небольшого подавления (в 0,59 раза) между P21 и P28. Из этого авторы настоящего изобретения сделали вывод, что серьезное подавление, наблюдаемое в случае промотора 4xGRM6-SV40 [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. **11**(161): p. 161.], вероятно не было связано с подавлением энхансерных элементов Grm6, а вероятно было следствием пониженной функциональности базального промотора SV40 с прогрессирующей дегенерацией. Следовательно, ген Grm6 был использован авторами настоящего изобретения в качестве матрицы для конструирования ОВС-специфического промотора.

Пример 2. Конструирование промоторов на основе GRM6

Для согласования с механизмом транскрипции человека в свете будущего применения в терапии человека авторы настоящего изобретения использовали в качестве матрицы последовательность человеческого гена GRM6, а не последовательность мышинового гена Grm6.

Авторы настоящего изобретения использовали Основной инструмент для поиска локального выравнивания (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), оптимизированный для "частично сходных" последовательностей (blastn) [Altschul et al., *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10; Coordinators, *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(D1): p. D8-D13], для выравнивания последовательностей мышинового гена Grm6 и человеческого гена GRM6. Для определения характеристик энхансера авторы настоящего изобретения выравнивали 1500 п. о. слева и справа от мышиной энхансерной последовательности 200En, идентифицированной Kim et al. [Kim et al., *J Neurosci*, 2008. **28**(31): p. 7748-64.]. Авторы настоящего изобретения обнаружили консервативную последовательность длиной 310 п. о. между геномами мыши и человека [от -13819 до -13510 отн. сайта начала трансляции (TLSS) из гена GRM6], выходящую за пределы последовательности 200En, определенной Kim et al. как в 3', так и в 5'-направлении (фигура 1А, участки, заштрихованные горизонтальными полосами). Чтобы идентифицировать промоторные последовательности, авторы настоящего изобретения сосредоточились на последовательностях гена GRM6, расположенных в 5'-направлении от сайта начала трансляции (TLSS, определен авторами настоящего изобретения как положение 0) (фигура 1В). После выравнивания авторы настоящего изобретения использовали геномный браузер Института геномики Калифорнийского университета в Санта-Круз (геномный браузер UCSC) [Church et al., *PloS Biol*, 2011. **9**(7): p. e1001091.], [Kent et al., *Genome Res*, 2002. **12**(6): p. 996-1006.; Kuhn et al. *Brief Bioinform*, 2013. **14**(2): p. 144-61.] [<https://genome.ucsc.edu/>; сборка генома, февраль 2009 г. (GRCh37/hg19)] для идентификации потенциальных регуляторных последовательностей гена GRM6, таких как межвидовые консервативные последовательности, области с активным хроматином (кластеры с гиперчувствительностью к ДНКазе или фрагменты метки H3K27Ac) или сайты связывания факторов транскрипции. Базу данных регуляции транскрипции генов

(GTRD) [Yevshin et al., Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D61-D67] дополнительно использовали для идентификации пиков иммунопреципитации хроматина и секвенирования ДНК (ChIP-seq), обеспечивая экспериментальное подтверждение сайтов связывания факторов транскрипции. В совокупности данная информация позволила авторам настоящего изобретения определить последовательности в идентифицированных выше областях с вероятной функциональной важностью в отношении экспрессии гена GRM6.

Затем авторы настоящего изобретения выбрали три возможные энхансерные области [407En(hGRM6), 444En(hGRM6) и 770En(hGRM6)] и две возможные промоторные области [566P(hGRM6) и 454P(hGRM6)] (фигура 1 и таблица 1) согласно следующему обоснованию: 407En(hGRM6) (от -13873 до -13467 отн. TLSS из гена GRM6) состоит из консервативной последовательности размером 300 п. о. между мышинным и человеческим геномами (заштрихована горизонтальными линиями на фиг. 1A). 770En(hGRM6) (от -14236 до -13467 отн. TLSS из гена GRM6) в дополнение к 407En(hGRM6) также содержит 3'-пики ChIP-seq и кластер с гиперчувствительностью к ДНКазе (от -13990 до -13816 отн. TLSS из гена GRM6). 444En(hGRM6) (от -14033 до -13590 отн. TLSS из гена GRM6) представляет собой усеченный на 3'- и 5'-концах вариант 770En(hGRM6), содержащий только 3' и 5' пики ChIP-seq.

При выравнивании последовательностей от -1000 до -1 (отн. TLSS) из гена GRM6 авторы настоящего изобретения идентифицировали консервативную область размером 167 п. о. (от -425 до -259 отн. TLSS из гена GRM6) (фиг. 1B, заштрихована горизонтальными линиями на фиг. 1B). Включив эту консервативную последовательность авторы настоящего изобретения сконструировали два промотора: 566P(hGRM6) (от -691 до -126 отн. TLSS из гена GRM6), дополнительно содержащий 5'-сайт начала транскрипции (TSS, -179 отн. TLSS из гена GRM6) и сигнальный 5'-пик метки H3K27Ac (от -656 до -405 отн. TLSS из гена GRM6), а также второй 3'-пик ChIP-Seq ERG. ERG известен как активатор, который взаимодействует с FLI1, содержащейся в 770En и 444En. Вторая выбранная промоторная последовательность 454P(hGRM6) (от -453 до +1 отн. TLSS из гена GRM6) простирается дальше 5'-конца по сравнению с 566P(hGRM6), включая TLSS и дополнительные потенциально регуляторные последовательности, расположенные между TLSS и TSS, такие как пики ChIP-Seq TCF7L1 и MYC.

Пять возможных комбинаций энхансерных и промоторных последовательностей (таблица 1), предшествующих репортерному трансгену, клонировали между последовательностями ITR вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), как подробно описано в приведенных ниже примерах с применением стандартных методов молекулярной биологии:

Таблица 1. Выбранные комбинации энхансер/промотор.

Название	Длина	№ последовательности
407En_454P(hGRM6)	867 п. о.	11

444En_454P(hGRM6)	917 п. о.	15
407En_566P(hGRM6)	978 п. о.	12
770En_454P(hGRM6)	1243 п. о.	13
770En_566P(hGRM6)	1354 п. о.	14

Пример 3. Оценка функционального промотора в сетчатке человека

Имея промотор, сконструированный для гена GRM6 человека в свете терапевтического применения у пациентов-людей, все промоторы оценивали в посмертных эксплантатах сетчатки человека. Для этого промоторы объединяли с трансгеном mCitrine и упаковывали в самокомплементарные (sc) капсиды AAV, в частности scAAV2(7m8) (Dalkara et al. Sci Transl Med 2013. **5**: p. 189ra76).

Примерно 5×10^6 vg (векторных геномов) добавляли к стороне RGC культивируемых посмертных эксплантатов сетчатки человека в день 1, как подробно описано в [van Wyk, M., et al., Front Neurosci, 2017. **11**(161): p. 161.]. Сетчатки замораживали на 7-й день культивирования, когда была визуально заметна экспрессия трансгена из scAAV. Авторы настоящего изобретения окрашивали криосрезы в отношении репортерного белка mCitrine и маркера OBC Goα, чтобы визуализировать локализацию экспрессии и сравнить значения интенсивности экспрессии. До 85% OBC экспрессировали mCitrine в хорошо трансдуцированных участках (фиг. 9). Чтобы сравнить производительность с современным уровнем техники, промотор Lu 200En-mGluR500P (Lu et al. Gene Ther, 2016. **23**: p. 680-9.) был также упакован в scAAV2 (7m8) и использован для трансдукции эксплантата сетчатки человека. Для каждого промотора культуры из трех глаз человека трансдуцировали конструкциями промоторов и криосрезы по всей сетчатке гистологически окрашивали и анализировали. Для контроля различий между экспериментами обработку и иммуногистохимический анализ проводили для всех образцов параллельно. Флуоресцентные изображения получали с помощью ZEISS LSM 880 с программным обеспечением Airyscan и ZEN 2.1. Микрофотографии, полученные посредством конфокальной микроскопии (z-стеки), были сделаны под 20x объективом с идентичными настройками микроскопа. Для определения средней эффективности трансдукции определяли цитоплазматическую флуоресценцию Alexa488 (вторичное антитело к mCitrine) в трансдуцированных клеточных телах OBC [mCitrine(+) и Goα(+)]. В частности, произвольные значения флуоресценции в соматическом участке OBC диаметром 4,15 мкм определяли с применением функции яркость программного обеспечения Fiji для обработки изображений. Анализы изображений, включая количественную оценку флуоресценции и подсчет клеток, выполняли с помощью Fiji ulfils. (версия 2.0.0, <https://fiji.sc/>, Schindelin et al., Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82). Для нормализации значение флуоресценции каждой экспрессирующей OBC [mCitrine(+) и Goα(+)] делили на среднее значение фоновой флуоресценции, определенное посредством измерений в неэкспрессирующих OBC [mCitrine(-) и Goα(+)]. Как видно из фигуры 2, базальный промотор 566P опосредовал самую слабую экспрессию mCitrine в OBC, тогда

как экспрессия под контролем 454P всегда была значительно интенсивнее, чем экспрессия под контролем промотора Lu 200En-mGluR500P, независимо от используемого энхансерного элемента. Поэтому для всех последующих экспериментов был выбран 454P. 770En_454P(hGRM6) (F равняется $6,03 \pm 1,53$; среднее значение $\pm$ s. d.) и 407En_454P(hGRM6) (F равняется $5,65 \pm 0,09$; среднее значение $\pm$ s. d.) проявляли одинаковую эффективность и были значительно лучше, чем 200En-mGluR500P, полученный из мыши Lu (F равняется $4,49 \pm 0,22$; среднее значение $\pm$ s. d.), и поэтому оба были проанализированы более подробно.

Пример 4. Значительно повышенная предпочтительность в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, в эксплантатах сетчатки человека

На следующей стадии срезы анализировали в отношении специфичности экспрессии типа клеток ОВС. С этой целью срезы окрашивали с помощью антител к трансгену mCitrine, антител к повсеместно встречающимся маркерам ОВС Gao и специфического антитела к РКCa в биполярных клетках, представляющих собой палочки. Клетки [mCitrine(+), РКCa(+), Gao(+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие ON-биполярные клетки, представляющие собой палочки (RBC), тогда как клетки [mCitrine(+), РКCa(-), Gao(+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие ON-биполярные клетки, представляющие собой колбочки (сОВС). Соответственно, клетки [mCitrine(-), РКCa(+)] были идентифицированы как неэкспрессирующие RBC, и клетки [mCitrine(-), РКCa(-), Gao(+)] были определены как неэкспрессирующие сОВС. Результаты, показанные на фигуре 3, ясно указывают, что как 770En_454P(hGRM6), так и 407En_454P(hGRM6) опосредуют значительно более высокую экспрессию трансгена в сОВС по сравнению с 200En-mGluR500P. Мету предпочтительности в отношении сОВС (фиг. 3В) определяли посредством нормализации количества экспрессирующих сОВС и RBC к общему количеству сОВС и RBC в анализируемом участке сетчатки. Такая нормализация продемонстрировала, что 770En_454P(hGRM6) (предпочтительность в отношении сОВС составляет 49,5%) и 407En_454P(hGRM6) (предпочтительность в отношении сОВС составляет 36,4%) обладают значительно повышенной способностью к управлению экспрессией в типе клеток сОВС по сравнению с 200En-mGluR500P (предпочтительность в отношении сОВС составляет 16,3%). Следует особо отметить, что 770En_454P(hGRM6) демонстрирует эквивалентную предпочтительность в отношении RBC и сОВС (~50% в каждом случае, фиг. 3В).

Также с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine трансдуцировали макулы эксплантированных сетчаток человека. Иммуномечение с помощью mCitrine, РКCa и Gao ясно продемонстрировало, что фовеа содержит только сОВС, и что 770En_454P(hGRM6) управляет экспрессией mCitrine практически во всех сОВС (фиг. 7). Способность эффективно управлять экспрессией трансгена в сОВС фовеа человека имеет большое значение для терапии человека, поскольку фовеа опосредует высокую остроту зрения и таким образом представляет собой первичную мишень для генной терапии

сетчатки, восстанавливающей зрение, - фовеа содержит только cOBC.

Пример 5. Специфичность 770En_454P(hGRM6) в отношении OBC по сравнению с 200En-mGluR500P

Высокая предпочтительность в отношении OBC необходима, чтобы избежать нецелевых эффектов, таких как искаженная передача сигнала в сетчатке. Срезы сетчатки человека метили антителами к mCitrine (трансгену), Goα (общему маркеру OBC) и ядерным красителем DAPI для различения слоев клеток. Это позволяет идентифицировать тип экспрессирующих клеток: фоторецепторные клетки (PR, mCitrine(+), расположены во внешнем ядерном слое), OBC [mCitrine(+), Goα(+)] и расположены во внутреннем ядерном слое], амакриновые клетки [AC, mCitrine(+), Goα(-)] и расположены во внутреннем ядерном слое] и ганглиозные клетки (GC, mCitrine(+), расположены в слое ганглиозных клеток). На фигуре 4А четко показано, что новый промотор 770En_454P(hGRM6) характеризуется значительно повышенной предпочтительностью в отношении OBC ($88,3 \pm 7,8\%$) по сравнению с 200En-mGluR500P ($70,1 \pm 12,2\%$). Кроме того, нецелевая экспрессия под контролем 200En-mGluR500P в целом была выше, в частности в AC ($16,9 \pm 9,1\%$), по сравнению с новым промотором 770En_454P(hGRM6) ($4,1 \pm 3,2\%$). Последнее имеет особенное значение для оптогенетического восстановления зрения, когда нецелевая экспрессия искажает передачу сигнала в сетчатке.

Пример 6. Оценка промотора в дегенерирующей сетчатке мыши

Важным для терапии сетчатки является доступность ткани для лечения. Это может быть сложной задачей при дегенеративном процессе с анатомическими, функциональными и транскрипционными изменениями. Авторы настоящего изобретения ранее показали, что мышинный промотор Kim 200En-SV40 больше не функционирует в мышинной модели быстрой дегенерации rd1 (van Wyk et al. Front Neurosci 2017. **11**: p. 161). Таким образом, эффективность 770En_454P(hGRM6) [и для сравнения его мышинового аналога 200En-mGluR500P [Lu et al. Gene Ther 2016. 23 p: 680-689] тестировали в мышинной модели дегенерации rd1. Промоторы объединяли с оптогенетическим MWOPN_-mGluR6-IRES2-TurboFP635 (SEQ ID NO: 16, плазмидная карта на фиг. 8) трансгеном и упаковывали в ssAAV2(7m8) (Dalkara et al. Sci Transl Med 2013. **5**: p. 189ra76). 3×10^9 vg вводили посредством интравитреальной инъекции, как описано в (van Wyk et al. Front Neurosci 2017. **11**: p. 161; van Wyk et al., PloS Biol 2015. **13**: p. e1002143), в глаза мышей rd1 в возрасте 22 недель на поздней стадии дегенерации. Через 4 недели после инъекций мышей подвергали эвтаназии и извлекали сетчатки для иммуногистохимического анализа, как описано ранее [van Wyk, M., et al., Front Neurosci, 2017. **11**(161): p. 161 ;van Wyk et al., PloS Biol 2015. **13**: p. e1002143]. Авторы настоящего изобретения помечали срезы антителом к трансгену TurboFP635, антителом к OBC-специфическому маркеру Goα и ядерным красителем DAPI. В отличие от 200En-SV40, 770En_454P(hGRM6), а также 200En-mGluR500P, полученный из гена Grm6 мышей Lu, функционировали в OBC сетчатки rd1 (фигура 5). Однако 200En-mGluR500P приводил к экспрессии только в ограниченных областях сетчатки, как в качестве примера показано на

фигуре 5А, тогда как 770En_454P(hGRM6) приводил к гораздо более обширной и широко распространенной трансдукции дегенерирующей сетчатки (фиг. 5В), вероятно вследствие его повышенной интенсивности экспрессии, которая преодолевает порог экспрессии, если имеет место некоторое подавление Grm6. Чтобы проанализировать специфичность и эффективность экспрессии трансгена (mCitrine), управляемой промотором 770En_454P(hGRM6) в дегенерирующей сетчатке, авторы настоящего изобретения осуществляли инъекции еще 9 мышам rd1 в еще более поздние временные точки (в возрасте 29-33 недель). Через 4 недели животных подвергали эвтаназии, глаза замораживали и делали срезы. Крисрезы снова метили антителами к mCitrine и Goα и анализировали под конфокальным микроскопом. Даже в данном случае, в этих полностью дегенерированных сетчатках ~67% всех клеток, экспрессирующих трансген [mCitrine (+), Goα (-)], представляли собой ОВС [mCitrine (+), Goα (+)]. Аналогичным образом, ~55% всех ОВС [mCitrine (-), Goα (+)] экспрессировали трансген [mCitrine (+), Goα (+)] (фиг. 5D). Широко распространенная и специфическая экспрессия терапевтического трансгена в дегенерирующей сетчатке имеет фундаментальное значение для эффективной генной терапии.

Пример 7. Оптигенетическая генная терапия и восстановление зрения у мышей rd1

Чтобы увидеть, поддерживают ли благоприятные свойства 770En_454P(hGRM6) функциональное оптигенетическое восстановление зрения, нацеленное на ОВС, авторы настоящего изобретения проводили доказательный эксперимент с мышинной моделью дегенерации rd1. Авторы настоящего изобретения путем инъекции билатерально вводили 3×10^9 vg ssAAV(7m8)-770En_454P(hGRM6)-MWOPN_mGluR6-IRES2-TurboFP635-WPRE-BGHpA (плазмидная карта, фиг. 8) трем мышам rd1, полностью лишенным фоторецепторов, в возрасте 22 недель. MWOPN_mGluR6 (SEQ ID NO 16) представляет собой химерный белок, полученный из опсина из мышинных колбочек, чувствительного к средней длине волны (MWOPN), и мышинового mGluR6, который функционирует аналогично Opto-mGluR6, опосредуя активность ОВС, и, исходя из этого, восстановление зрения (van Wyk et al., PloS Biol 2015. **13**: p. e1002143). Авторы настоящего изобретения измеряли остроту зрения посредством выявления оптомоторных ответов (OMR) (согласно [Prusky et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(12): p. 4611-6.]) в разные временные точки (дни 41, 47, 55, 82 и 112) после введения в автоматизированный виртуальный барабан OptoDrum (Striatech®), содержащий небольшую камеру (54×54×30 см) с четырьмя экранами (Full-HD IPS-панели с диагональю 23,8"), окружающими платформу, на которой может быть размещено животное. Яркость экранов доводили до 250 кд/м², а дно и верх камеры закрывали зеркалами. С помощью компактной камеры для технической съемки (IR-чувствительный CMOS-датчик размером 1/3" с глобальным затвором и широкоугольным объективом, F1,6) отслеживали движения головы мышей сверху, при этом на экране на разных пространственных частотах отображался вращающийся паттерн из черных и белых несинусоидальных вертикальных полос. С помощью программного обеспечения Optodrum анализировали записанные движения головы и контролировали

толщину, контрастность и скорость применяемых стимулов. Скорость движущихся полос была установлена на 12°/с, а контрастность на 100%. Как показано на фигуре 6, медианную остроту зрения каждой мыши определяли на основе всех измеренных значений остроты зрения в различных испытаниях. Медианная острота зрения обработанных мышей составляла $0,29 \pm 0,03$ циклов/° (n равняется 3, $\pm$ s.d., P равняется 0,0048), что значительно лучше, чем у контрольных мышей rd1 без инъекций с $0,15 \pm 0,06$ циклов/° (n равняется 7, P равняется 194 или больше), но все же хуже, чем у мыши C57BL/6 для положительного контроля с нормальным зрением, которая характеризовалась средней остротой зрения $0,43 \pm 0,05$ циклов/° (n равняется 10, s.d., P равняется 0,0006). Однако оптогенетическое средство терапии, нацеливающееся на ОВС, привело к заметному улучшению оптомоторного ответа. В совокупности результаты доказывают, что 770En_454P(hGRM6) удовлетворяет всем требованиям для генной терапии человека, нацеливающейся на ОВС, представляя собой короткий (1243 п. о.) промотор на основе человеческого гена, который при дегенерации по-прежнему является высокоэффективным и специфическим в отношении ОВС, включая сОВС.

Материалы и способы

Анализы биоактивности

Анализы биоактивности описаны в приведенных выше разделах примеров. Культивирование и трансдукция эксплантатов сетчатки человека с помощью AAV, а также интравитреальная инъекция AAV в глаза мышей и последующая иммуногистохимическая обработка замороженных срезов сетчатки подробно описаны в другом месте [van Wyk, M., et al., Front Neurosci, 2017. **11**(161): p. 161.].

Определение специфичности в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки

С этой целью криосрезы сетчатки три раза обрабатывали антителами к трансгену mCitrine (Invitrogen, A11122, 1:500), антителами к повсеместно встречающемуся маркеру ОВС Gao (EMD, MAB3073, 1:750) и специфическим в отношении RBC антителом к PKC α (Santa Cruz, sc8393, 1:750). Клетки [mCitrine(+), PKC α (+), Gao(+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие RBC, тогда как клетки [mCitrine(+), PKC α (-), Gao(+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие сОВС. Предпочтительность в отношении типа ОВС, как изображено на фигуре 3А, определяли по соотношениям экспрессирующих сОВС и всех ОВС [mCitrine(+), PKC α (-), Gao(+)]/[Gao(+)] и предпочтительность в отношении типа RBC определяли по соотношению экспрессирующих RBC и всех ОВС [mCitrine(+), PKC α (+), Gao(+)]/[Gao(+)]. Чтобы получить меру предпочтительности экспрессии в сОВС, другими словами, вероятность того, что экспрессия в сОВС происходит, авторы настоящего изобретения определяли соотношение количества экспрессирующих сОВС и RBC соответственно и количества сОВС и RBC в данном конкретном анализируемом участке сетчатки. Эта нормализация была возможной, поскольку клетки [mCitrine(-), PKC α (+), Gao(+)] можно четко идентифицировать как неэкспрессирующие RBC, а клетки [mCitrine(-), PKC α (-),

Gαo(+)] как неэкспрессирующие сОВС. Таким образом, соотношение [mCitrine(+), PKCα(+), Gαo13(+)]/[mCitrine(-), PKCα(+), Gαo(+)] представляет собой процент трансдуцированных и экспрессирующих RBC, тогда как соотношение [mCitrine(+), PKCα(-), Gαo(+)]/[mCitrine(-), PKCα(-), Gαo(+)] представляет собой процент трансдуцированных и экспрессирующих сОВС в соответствующем анализируемом участке сетчатки. Поэтому результирующие проценты, показанные на фиг. 3В, указывают на вероятность того, что сОВС является трансдуцированной.

Программное обеспечение, использованное для молекулярной инженерии

Авторы настоящего изобретения использовали геномный браузер Института геномики Калифорнийского университета в Санта-Круз (геномный браузер, <https://genome.ucsc.edu/>) [Kent et al., Genome Res, 2002. 12(6): p. 996-1006; Kuhn et al., Brief Bioinform, 2013. 14(2): p. 144-61] для изучения геномных последовательностей промоторов и аннотаций генома.

Для идентификации факторов транскрипции и сайтов связывания факторов транскрипции, которые, вероятно, участвуют в регуляции экспрессии генов, контролируемой новыми промоторами на основе GRM6, авторы настоящего изобретения использовали данные ChIP-seq из базы данных регуляции транскрипции генов (GTRD, gtrd.biouml.org/) [Yevshin et al., Nucleic Acids Res, 2017. 45(D1): p. D61-D67]

Плазмидные карты создавали с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance (версии 11.5.2).

Антитела

Таблица 3. Антитела, использованные для иммуногистохимического анализа

Первичные антитела	1_1	Антитело к GFP	Кролик	Invitrogen	A-11122	1:500
	1_2	Антитело к GFP	Курица	Abcam	ab13970	1:500
	1_3	Антитело к tRFP	Кролик	Evrogen	AB234	1:500
	1_4	Антитело к PKCα	Мышь	Santa Cruz Biotechnology	sc-8393	1:750
	1_5	Антитело к Gαo	Мышь	EMD Millipore	MAB3073	1:750
	1_6	Антитело к Gγ13	Кролик	Santa Cruz Biotechnology	sc-368324	1:500
Вторичные антитела		Антитело к кроличьему антителу, конъюгированное с Alexa Fluor 488	Коза	Invitrogen	A-11008	1:400
	2_1					
	2_2	Антитело к	Коза	Invitrogen	A-10521	1:400

	мышинному					
	антителу,					
	конъюгированно					
	е с цианином 3					
	Антитело к					
	кроличьему					
2_3	антителу,	Осел	Invitrogen	A-21206	1:400	
	конъюгированно					
	е с Alexa Fluor					
	488					
	Антитело к					
	куриному		Jackson			
2_4	антителу,	Осел	Imm.Research	703-175-	1:400	
	конъюгированно		Laboratories	155		
	е с цианином 5					

Аппаратное и программное обеспечение для визуализации посредством конфокальной микроскопии

ZEISS LSM 880 с детектором Airyscan и программным обеспечением ZEN 2.1 использовали для получения изображений посредством конфокальной микроскопии с 20x или 40x объективом. Изображения обрабатывали и оценивали в Fiji [Schindelin et al., Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.]. Плагин счетчика клеток использовали для подсчета клеток и стандартные инструменты Fiji использовали для обработки изображений. Плагин Stitch [Preibisch et al., Bioinformatics, 2009. **25**(11): p. 1463-5.] использовали в случаях, когда Fiji не удавалось автоматически объединить расположенные рядом изображения, полученные посредством сканирования.

Статистические анализы

Если не указано иное, значения сравнивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента и приводили средние значения $\pm$ стандартное отклонение для биологических образцов на протяжении всей данной работы. Уровни значимости обозначены звездочками: * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и *** означает, что P равняется 0,001 или меньше.

Другие способы

Остальные способы, не описанные выше и в примерах 1 и 2, можно найти в [van Wyk, M., et al., Front Neurosci, 2017. **11**(161): p. 161.].

Последовательности

Таблица 4. Последовательности, использованные в данном исследовании

Название	SEQ ID	Тип	Происхождение
----------	--------	-----	---------------

	NO.		
407En(hGRM6)	1	Нуклеиновая кислота	Человек
770En(hGRM6)	2	Нуклеиновая кислота	Человек
444En(hGRM6)	3	Нуклеиновая кислота	Человек
429En(mGrm6)	4	Нуклеиновая кислота	Мышиная
792En(mGrm6)	5	Нуклеиновая кислота	Мышиная
460En(mGrm6)	6	Нуклеиновая кислота	Мышиная
454P(hGRM6)	7	Нуклеиновая кислота	Человек
566P(hGRM6)	8	Нуклеиновая кислота	Человек
454P(mGrm6)	9	Нуклеиновая кислота	Мышиная
566P(mGrm6)	10	Нуклеиновая кислота	Мышиная
407En_454P(hGRM6)	11	Нуклеиновая кислота	Человек
407En_566P(hGRM6)	12	Нуклеиновая кислота	Человек
770En_454P(hGRM6)	13	Нуклеиновая кислота	Человек
770En_566P(hGRM6)	14	Нуклеиновая кислота	Человек
444En_454P(hGRM6)	15	Нуклеиновая кислота	Человек
MWOPN_mGluR6	16	Нуклеиновая кислота	Мышиная
IRES2	17	Нуклеиновая кислота	Пикорнавирус
mCitrine	18	Нуклеиновая кислота	Aequorea victoria
TurboFP635	19	Нуклеиновая кислота	Entasmaea quadricolor
WPRE	20	Нуклеиновая кислота	Вирус гепатита В сурков
pA BGH	21	Нуклеиновая кислота	Крупный рогатый скот
pA sNRP-1	22	Нуклеиновая кислота	Человек
Капсид AAV2 WT	23	Аминокислота	Вирус
Последовательность KOZAK a)	24	Нуклеиновая кислота	Эукариоты
Последовательность KOZAK b)	25	Нуклеиновая кислота	Эукариоты

SEQ ID NO. 1: **407En(hGRM6)**

1 ctctgatttt aaaggaagta gatacttcaa ataattcatc atggagtgca 50
 51 atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 100
 101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atgttatcaa 150
 151 atgctttttc tgcattccatt tagataatca tgttttccct ttaatctgtt 200
 201 aatgcggtga attacattaa tagatttctc aagtcattaa tctgctaaag 250
 251 tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tgtatttcag 300
 301 ttgcaaata ttggactagg atttttgtat ctatattcct tagtttgacc 350
 351 tgtaaatttt atttcttgta ctaagtatta gcctcacgaa aggcatgtgc 400
 401 aaatgtt 407

SEQ ID NO. 2: **770En(hGRM6)**

1 ggggtctcaa ctgccaaact gtagatcttg gaacctttca tccttcataa 50
 51 ctgcataagc caattccttc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
 101 taataaatat gtacttcat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
 151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcatc tatctatcta 200
 201 tttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgttttat 300
 301 gtcttttttt ctgactga ctagtgcccc ctagaggga tgataattgg 350
 351 aattattgtc ttgctctgat tttaaaggaa gtagatactt caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttagtagata acttcatcag 450
 451 tttaaagaag atccttagat tatgaaacat ttacaattat gaatgaatat 500
 501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atttagataa tcatgttttt 550
 551 cctttaatct gttaatgcgg tgaattacat taatagattt cctaagtcac 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagacttgg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggatttttg tatctatatt 700
 701 ccttagtttg acctgtaaat ttatttctt gtactaagta ttagcctcac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt 770

SEQ ID NO. 3: **444En(hGRM6)**

1 atctattctc tgtgtctttg gagaaccctg acatagtaag caatcatatc 50
 51 acctgcaaat gatgaaagct gtgtatttcc caaatcagtc gttttatgtc 100
 101 tttttttctt gcaactgacta gtgcccccta gaggggaatga taattggaat 150
 151 tattgtcttg ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc 200
 201 atggagtgcg atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt 250
 251 aaagaagatc cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag 300
 301 atgttatcaa atgcttttcc tgcattccatt tagataatca tgttttccct 350
 351 ttaattctgtt aatgcgggtga attacattaa tagatttccct aagtcattaa 400
 401 tctgctaagc tgcattcttg ggacaaacca gacttggtta tgac 444

 SEQ ID NO. 4: **429En(mGrm6)**, мышинная последовательность, соответствующая
 407En(hGRM6)

1 aaaacatacc actttagttt aaggactata gtgattccac actaggtgaag 50
 51 gtgctttctg taggctttta gttaatagtt ttgtcaagct aaagaagatc 100
 101 tccagatggc taaactttta aatcatgaat gaagtagata ttaccaaatt 150
 151 gctttttcag catccattta gataatcatg tttttgcct ttaattctgt 200
 201 aatgtagtga attacagaaa tacatttccct aaatcattac atcccccaaa 250
 251 tcgttaattc gctaaagtac atctctggct caaacaagac tgggtgtgac 300
 301 aggtttgtct ctgtcagttt gtgactgttg ggctggctct tctaccct 350
 351 ctgcttcttg gtttggcctg aacattaatt ttattttatt ttttaattt 400
 401 tactacaat caatttcaca atgtgtgtt 429

 SEQ ID NO. 5: **792En(mGrm6)**, мышинная последовательность, соответствующая
 770En(hGRM6)

1 ggtctcaaca agatacaaat tatgttctct aggtagcaat taacacaagg 50
 51 aacgccttga ggtatgggag ggggtaggaa gctcacaaga tagaccctgg 100
 101 tgcctggaag gaagacagcc aactaaaggc catatcacag tgtcccgga 150
 151 accaacttga agggcttctg ctgtacaaat gtgggagaat ttcatcgtca 200
 201 gaaggctctg caaaggctcg aaagtcaccg aactctgtaa gattctatcc 250
 251 tgcttctatt cctgtcaaaa tataccagaa ggaatggaac taccctcc 300
 301 aaaaaataaa taaacaaaca aaccaccaaa ccacgcacag acaaagcatt 350

351 caatacacat gctaaaacat accactttag ttaaggact atagtattc 400
 401 cactaggt aagggtctt ctgtaggctt ttgttaata gtttgtcaa 450
 451 gctaaagaag atctccagat ggctaaactt taaatcatg aatgaagtag 500
 501 atattaccaa attgctttt cagcatccat ttagataatc atgtttttg 550
 551 cctttaatct gttaatttag tgaattacag aaatacattt cctaaatcat 600
 601 tacatcccc aaatcgtaa tctgctaaag tacatctctg gctcaacaa 650
 651 gactggttg gacaggttg tctctgcag ttgtgactg ttgggctggc 700
 701 tcttctacc cctctgctt ttggttggc ctgaacatta attttattt 750
 751 attttttaa tttaacctac aatcaattc acaatgtgtg tt 792

SEQ ID NO. 6: **460En(mGrm6)**, мышинная последовательность, соответствующая 444En(hGRM6)

1 ggctctgcaa aggtctgaaa gtcaccgaac tctgtaagat tctatcctgc 50
 51 ttctattect gtcaaaatat accagaagga atggaactac cccctccaaa 100
 101 aaataaataa acaacaaac caccaacca cgcacagaca aagcattcaa 150
 151 tacatagct aaaacatacc actttagttt aaggactata gtgattccac 200
 201 actaggttag gtgctttctg taggctttta gttaatagtt ttgtcaagct 250
 251 aaagaagatc tccagatggc taaacttta aatcatgaat gaagtagata 300
 301 ttaccaaatt gcttttcag catcattta gataatcatg tttttgcct 350
 351 ttaatctgtt aatgtagtga attacagaaa tacatttcct aaatcattac 400
 401 atccccaaa tcgttaatct gctaaagtac atctctggct caaacaagac 450
 451 tggttgtgac 460

SEQ ID NO. 7: **454P(hGRM6)**

1 ggaggggtct ccacctcgg agcgggtctt catccctccc tagaatcctt 50
 51 aaatctctc tcgctcagg cctcggccgc atctgtcaca gacttgcct 100
 101 gaaccgacag cggctggcgc aggtgactgg cttggggcgg gagcctgggt 150
 151 gtgcgtggg gatggacccc gaggaagagg ggccaagctg tcgggaagcg 200
 201 gcagggtgag aggggtggag gcagtggctg ggcgggaccc cgggcgacag 250
 251 ggttcggcgc ttgtaagagc gagacggagg cccgggcagg cgggtgagc 300
 301 taactcccca gagccgaagt ggaaggcgcg ccccgagcgc cttctccca 350

351 ggacccccgt gtcctcccc gcgccccgag cccgcgtct ccttccccg 400
 401 ccctcagagc gctccccgcc cctctgtct cccgcagccc gctagacgag 450
 451 ccga 454

SEQ ID NO. 8: **566P(hGRM6)**

1 ccaagaagag gacagaggca gaaagccagg gacagagact gagaacaga 50
 51 gacctagagg cagaagaaga ctgagataga gatggacaga gattgtgtca 100
 101 gacacagccc cagagacagc cagacagtct gagtcagacg caaaccaaag 150
 151 acaagaaaac aggaaaacag acccagagat tgggagaggg aggggaagga 200
 201 gatgcgggga gagccagcac cgccacccc cactcagg aggggtctcc 250
 251 accctcggag cgggtctca tcctcccta gaatcctaa atctctctc 300
 301 gctcagggcc tcggccgcat ctgtcacaga ctgtcctga accgacagcg 350
 351 gctggcgag gtgactggct tggggcggga gcctgggtgt gcgctgggga 400
 401 tggacccga ggaagagggg ccaagctgtc gggaagcggc agggctggag 450
 451 ggggtggagg agtggtcggg cgggacccc ggcgacaggg ttcggcgctt 500
 501 gtaagagcga gacggaggcc cgggcaggcc ggctgagcta actccccaga 550
 551 gccgaagtgg aaggcg 566

SEQ ID NO. 9: **454P(mGrm6)**, мышинная последовательность, соответствующая 454P(hGRM6)

1 agagagaaga gagcccttc tcactctca agctctggag ggggtctctg 50
 51 ccctaccct cctccctcc cagaatcctt aaatcctta gactgtagct 100
 101 ctgattttac agctgtcaca gactctct actagccaga ggttggtca 150
 151 ggtaagcacc actgggagg tagcctaggg tgcgtgggg tgggtccaga 200
 201 ggaagagctg ccagaactg tgggggaagg agcgggaccg accatcaaca 250
 251 gggggacttt tcaggagaa tgagagcaat cctctggagg cctgggagag 300
 301 gctgctgagt tgctggtgcg cgagtcacca actttcctg cgctctcgt 350
 351 gtccggccag aatcccgaag tggcagctga gcacggggtg gcagcttctg 400
 401 ccgccggctc tcaaggcgtc ccgtaactt ccttcccg agtccaggag 450
 451 caga 454

SEQ ID NO. 10: **566P(mGrm6)**, мышинная последовательность, соответствующая 566P(hGRM6)

```

1 gaccgaccag gggagtcctt ggacttcttt gttctcttc tcggggtggc 50
51 gggactgatt gtgtaaactt cttatctcca actttcactc ttatctgtct 100
101 cttaatcgg catattgagg atgagtggcc aagcttattg gtgttgctgg 150
151 gtcagacaat ttaaaggcag tctaggggag aagcagaccc agggagttag 200
201 agaggcagag agagaagaga gcccttcctc cactctcaag ctctggaggg 250
251 ggtctctgcc ctcacctca tccctcccca gaatccttaa atcctctaga 300
301 ctgtagctct gattttacag ctgtcacaga ctgctctac tagccagagg 350
351 ttggctcagg taagcaccac tggggaggta gcctagggtg cgctggggtg 400
401 ggtccagagg aagagctgcc cagaactgtg ggggaaggag cgggaccgac 450
451 catcaacagg gggacttttc agggagaatg agagcaatcc tctggaggcc 500
501 tgggagaggg tgctgagttg ctggtgcgcg agtcaccaac ttttctgcg 550
551 ctctcggtgt ccggcc                                     566

```

SEQ ID NO. 11: **407En_454P(hGRM6)**

```

1 ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc atggagtgca 50
51 atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 150
101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atgttatcaa 200
151 atgctttttc tgcattcatt tagataatca tgttttcct ttaatctgtt 250
201 aatgcggtga attacattaa tagatttctt aagtcattaa tctgctaaag 300
251 tgcattttct ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tgtatttcag 350
301 tttgcaaata ttgactagg atttttgtat ctatattcct tagtttgacc 400
351 tgtaaatttt atttcttcta ctaagtatta gcctcacgaa aggcattgtc 450
401 aatgttgct agcggagggg tctccacct cggagcggtc tctcatcct 500
451 ccctagaatc cttaaactct ctctcgctca gggcctcggc cgcattctgc 550
501 acagacttgt cctgaaccga cagcggctgg cgcaggtagc tggcttgggg 600
551 cgggagcctg ggtgtgcgct ggggatggac cccgaggaag aggggccaag 650
601 ctgtcgggaa gcggcagggc tggaggggtg gaggcagtgg tcgggcggga 700
651 ccccgggcga cagggttcgg cgcttgtaag agcgagacgg agggccgggc 750
701 agggccgctg agctaactcc ccagagccga agtggaaggc gcgccccgag 800

```

751 cgccttctcc ccaggacccc ggtgtccctc cccgcgcccc gagccccgcg 850
 801 tctcttctcc cggccctcag agcgtctccc gccctctgt ctecccgag 900
 851 cccgctagac gagccga 867

SEQ ID NO. 12: **407En_566P(hGRM6)**

1 ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc atggagtgc 50
 51 atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 100
 101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atgttatcaa 150
 151 atgcttttgc tgcattcatt tagataatca tgtttttctt ttaatctgtt 200
 201 aatgcggtga attacattaa tagatttcct aagtcattaa tctgctaaag 250
 251 tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tgtatttcag 300
 301 tttgcaaata ttggactagg atttttgtat ctatattcct tagtttgacc 350
 351 tgtaaatttt atttcttgta ctaagtatta gcctcacgaa aggcattgtc 400
 401 aaatgttgct agccaagaag aggacagagg cagaaagcca gggacagaga 450
 451 ctgagaaaca gagacctaga ggcagaagaa gactgagata gagatggaca 500
 501 gagatttgtg cagacacagc cccagagaca gccagacagt ctgagtcaga 550
 551 cgcaaaccaa agacaagaaa acaggaaaac agaccagag attgggagag 600
 601 ggagggggaag gagatgcggg gagagccagc accgccaccc cccacactca 650
 651 ggaggggtct ccacctcgg agcgggtctc catccctccc tagaatcctt 700
 701 aaatcctctc tcgctcaggg cctcggccgc atctgtcaca gacttgcct 750
 751 gaaccgacag cggctggcgc aggtgactgg ctggggcgg gagcctgggt 800
 801 gtgcgctggg gatggacccc gaggaagagg ggccaagctg tcgggaagcg 850
 851 gcagggctgg aggggtggag gcagtggctg ggcgggaccc cgggcgacag 900
 901 ggttcggcgc ttgtaagagc gagacggagg cccgggcagg ccggtgagc 950
 951 taactcccca gagccgaagt ggaaggcg 978

SEQ ID NO. 13: **770En_454P(hGRM6)**

1 gggctcctca cttgccaact gtagatcttg gaaccttca tcttcataa 50
 51 ctgcataagc caattccttc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
 101 taataaatat gtacttcat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
 151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcct tatctatcta 200

201 ttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgtttat 300
 301 gtctttttt cttgactga ctagtgtccc ctgagaggaa tgataattgg 350
 351 aattattgtc ttgtctgat tttaaaggaa gtagataact caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttagtagata acttcatcag 450
 451 tttaaagaag atccttagat tatgaaacat ttacaattat gaatgaatat 500
 501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atttagataa tcatgtttt 550
 551 cctttaatct gtaaatgcgg tgaattacat taatagattt cctaagtcac 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagacttgg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggattttt tatctatatt 700
 701 ccttagtttg acctgtaaat ttatttctt gtactaagta ttagcctcac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt caattgatat aatgctagcg gaggggtctc 800
 801 caccctcgga gcgtctctc atccctccct agaatcctta aatcctctc 850
 851 cgctcagggc ctggtccgca tctgtcacag acttgtctg aaccgacagc 900
 901 ggctggcgca ggtgactggc ttggggcggg agcctgggtg tgcgctgggg 950
 951 atggaccccc aggaagaggg gccaaagctgt cgggaagcgg cagggtgga 1000
 1001 ggggtggagg cagtggctgg gcgggacccc gggcgacagg gttcggcgct 1050
 1051 tgtaagagcg agacggaggc ccgggcagge cggtgagct aactccccag 1100
 1101 agccgaagtg gaaggcgcgc ccgagcgcc ttccccag gaccccggtg 1150
 1151 tccctccccg cgccccgagc ccgcgtctc ctccccgc cctcagagcg 1200
 1201 cccccgcc ctctgtctcc ccgagcccc ctgacgagc cga 1243

SEQ ID NO. 14: **770En_566P(hGRM6)**

1 gggctccaa cttgccaact gtagatctt gaaccttca tcttcataa 50
 51 ctgcataagc caattcctc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
 101 taataaatat gtacttcat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
 151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcatc tatctatcta 200
 201 ttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgtttat 300
 301 gtctttttt cttgactga ctagtgtccc ctgagaggaa tgataattgg 350
 351 aattattgtc ttgtctgat tttaaaggaa gtagataact caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttagtagata acttcatcag 450
 451 tttaaagaag atccttagat tatgaaacat ttacaattat gaatgaatat 500

501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atttagataa tcatgtttt 550
 551 cctttaatct gtaaatgcgg tgaattacat taatagattt cctaagtcac 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagacttg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggattttt tatctatatt 700
 701 ccttagttg acctgtaaat tttatttct gtactaagta ttagcctcac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt caattgatat aatgctagcc aagaagagga 800
 801 cagaggcaga aagccagga cagagactga gaaacagaga ctagaggga 850
 851 gaagaagact gagatagaga tggacagaga ttgtgtcaga cacagccca 900
 901 gagacagcca gacagtctga gtcagacgca aaccaaagac aagaaaacag 950
 951 gaaaacagac ccagagattg ggagagggag gggaaggaga tgcggggaga 1000
 1001 gccagcaccg ccacccccca cactcaggag gggctctccac cctcggagcg 1050
 1051 gtctctcatc cctccctaga atccttaaat cctctctcgc tcagggcctc 1100
 1101 ggccgcattc gtcacagact tgtctgaac cgacagcggc tggcgaggt 1150
 1151 gactggcttg gggcgggagc ctgggtgtgc gctggggatg gaccccgagg 1200
 1201 aagaggggcc aagctgtcgg gaagcggcag ggctggaggg gtggaggcag 1250
 1251 tggtcgggcg ggaccccggg cgacagggtt cggcgcttgt aagagcgaga 1300
 1301 cggaggcccg ggcaggccgg ctgagctaac tcccagagc cgaagtggaa 1350
 1351 ggcg 1354

SEQ ID NO. 15: **444En_454P(hGRM6)**

1 atctattctc tgtgtctttg gagaaccctg acatagtaag caatcatatc 50
 51 acctgcaaat gatgaaagct gtgtatttc caaatcagtc gttttatgtc 100
 101 ttttttctt gcactgacta gtgcccccta gaggggaatga taattggaat 150
 151 tattgtcttg ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc 200
 201 atggagtgc atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt 250
 251 aaagaagatc cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag 300
 301 atgttatcaa atgcttttc tgcattccatt tagataatca tgttttcct 350
 351 ttaatctgtt aatgcggtga attacattaa tagatttcct aagtcattaa 400
 401 tctgctaaag tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgaccaattg 450
 451 atataatgct agcggagggg tctccaccct cggagcggtc tctcatcct 500
 501 cctagaatc cttaaatcct ctctcgtca gggcctcggc cgcattctgc 550
 551 acagacttgt cctgaaccga cagcggctgg cgcaggtgac tggcttgggg 600
 601 cgggagcctg ggtgtgcgct ggggatggac cccgaggaag aggggccaag 650

651 ctgtcgggaa gcggcagggc tggaggggtg gaggcagtgg tcgggcggga 700
 701 cccccggcga caggggttcgg cgcttgaag agcgagacgg agggccgggc 750
 751 agggcgggtg agctaactcc ccagagccga agtgggaaggc gcgccccgag 800
 801 cgccttctcc ccaggacccc ggtgtccctc cccgcgcccc gagcccgcgc 850
 851 tctccttccc ccgccctcag agcgctcccc gccctctgt ctccccgcag 900
 901 cccgctagac gagccga 917

SEQ ID NO. 16: **MWOPN_mGluR6**

1 atggccaaa ggcttacagg tgaacagaca ctggaccact atgaggatag 50
 51 cacccatgca agcatctca cctataccaa cagcaacagc accaaaggte 100
 101 cctttgaagg cccaattat cacattgctc ccaggtgggt gtaccacctc 150
 151 accagcacct ggatgattct tgtgtcgtt gcattctgtc tctaattgg 200
 201 acttgtctg gcagccacca tgagattcaa gaagctgcgc catccactga 250
 251 actggattct ggtgaacttg gcagttgctg acctagcaga gaccattatt 300
 301 gccagcacta tcagtgtgtg gaaccaaate tatggctact tcgttctggg 350
 351 acaccctctg tgtgtcattg aaggctacat tgtctcattg tgtggaatca 400
 401 caggcctctg gtcctggcc atcatttctt gggagagatg gctggtggtc 450
 451 tgcaagccct ttggcaatgt gagatttgat gctaagctgg cactgtggg 500
 501 aatcgcttcc tctgggtct gggctgctat atggacggcc ccaccaatct 550
 551 ttggttgagg caggactgg cttatggcc tgaagacatc ctgtggccca 600
 601 gacgtgttca gcgtacctc gtacccggg gttagctt atatgatgtg 650
 651 cctcatggtc acgtgctgca tcttccact cagcatcacc gtgctctgct 700
 701 acctccaagt gtggctggcc atccgagcag tggcaaagca acagaaagaa 750
 751 tctgagtcca ctgagaaggc cgagaaggag gtgacacgca tgggtgtgtg 800
 801 gatggtcttc gcatactgcc tctgctggg accctatact ttctttgcat 850
 851 gctttgtac tgccaccct ggctatgct tccaccctct tgtggcctcc 900
 901 ctaccatcct actttgcaa aagtgccact atctacaacc ccattatcta 950
 951 tgtctttatg aaccggcagt ttcgaaactg catcttacct ctctttggaa 1000
 1001 agaaggttga tgatagctct gaactttcca gcacctcaa gacagaagtc 1050
 1051 tcactgtct ctcagtgtc acctgcagag cagaacgtgc agaagcggaa 1100
 1101 gcgcagctc aagaagacct ccacgatggc ggccccgcc aagagcgaga 1150
 1151 actcagagga cgccaagaca gagaccagcc aagtggcgcc tgccaagagc 1200
 1201 aggatcacca gcgagggcga gtacatcccc ctggaccaga tcgacatcaa 1250

1251 cgtgtaa

1257

SEQ ID NO. 17: **IRES2**

1 gccccctctcc ctcccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttgga 50
 51 taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta tttccacca tattgccgtc 100
 101 ttttggaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca 150
 151 ttctagggg tctttccct ctcgccaag gaatgcaagg tctgttgaat 200
 201 gtcgtgaagg aagcagtcc tctggaagct tctgaagac aaacaacgtc 250
 251 tgtagegacc cttgcaggc agcggaacct cccacctggc gacaggtgcc 300
 301 tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaa ggcggcacia 350
 351 cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtgaaagag tcaaatggct 400
 401 ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc 450
 451 attgtatgg atctgatctg gggcctcgt gcacatgctt tacatgtgt 500
 501 tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt 550
 551 tttccttga aaaacacgat gataatatgg ccaca 585

SEQ ID NO. 18: **mCitrine**

1 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt 50
 51 cgagctggac ggcgacgtaa acggccacia gttcagcgtg tccggcgagg 100
 101 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc 150
 151 accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca ccttcggcta 200
 201 cggcctgatg tgettgcgcc gctacccga ccacatgaag cagcacgact 250
 251 tctcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg 350
 351 cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg 400
 401 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactaaa cagccacaac 450
 451 gtctatatca tggccgacia gcagaagaac ggcatcaagg tgaactcaa 500
 501 gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctgcc gaccactacc 550
 551 agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 601 tacctgagct accagtcaa gctgagcaa gacccaacg agaagcgca 650
 651 tcatatggtc ctgctggagt tctgaccgc cgccgggac actctcgga 700
 701 tggacgagct gtacaagtcc ggataa 726

SEQ ID NO. 19: **TurboFP635**

1 atggtgggtg aggatagcgt gctgatacc gagaacatgc acatgaaact 50
 51 gtacatggag ggcaccgtga acgaccacca cttcaagtgc acatccgagg 150
 101 gcgaaggcaa gccctacgag ggcaccaga ccatgaagat caaggtggtc 200
 151 gagggcggcc ctctcccctt cgccttcgac atcctggcta ccagcttcat 250
 201 gtacggcagc aaaaccttta tcaaccacac ccagggcac cccgacttct 300
 251 ttaagcagtc cttccctgag ggcttcacat gggagaggat caccacatac 350
 301 gaagacgggg gcgtgctgac cgctaccag gacaccagc tccagaacgg 400
 351 ctgctcacc tacaacgtca agatcaacgg ggtgaactc ccatccaacg 450
 401 gccctgtgat gcagaagaaa acactcggct gggaggccag caccgagatg 500
 451 ctgtaccccg ctgacagcgg cctgagaggc catagccaga tggccctgaa 550
 501 gctcgtgggc gggggctacc tgcactgctc cctcaagacc acatacagat 600
 551 ccaagaaacc cgctaagaac ctcaagatgc ccggcttcta ctctgtggac 650
 601 aggagactgg aaagaatcaa ggaggccgac aaagagacct acgtcgagca 700
 651 gcacgagatg gctgtggcca ggtactgca cctgcctagc aaactggggc 750
 701 acagctga 708

SEQ ID NO. 20: **WPRE**

1 aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa 50
 51 ctatgttct cttttacgc tatgtggata cgctgctta atgcctttgt 100
 101 atcatgetat tgettcccgt atggctttca tttctctc cttgtataaa 150
 151 tcttggtgc tgtctctta tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg 200
 201 tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca 250
 251 ttgccaccac ctgtcagctc cttccggga ctttcgctt cccctccct 300
 301 attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgccgct gctggacagg 350
 351 ggctcggctg ttgggcactg acaattccgt ggtgtgtcg gggaaatcat 400
 401 cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgtt ccacctggat tctgcgcggg 450
 451 acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttcctc 500
 501 ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt cg 542

SEQ ID NO. 21: **pA BGH**

1 gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgttt gcccctcccc 50
 51 cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttctaata 100
 101 aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg 150
 151 ggggggtgggg tgggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 200
 201 caggcatgct gggga 215

SEQ ID NO. 22: **pA sNRP-1**

1 aaataaaata cgaaatg 17

SEQ ID NO. 23: Капсид AAV2 WT

MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD 60
 KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120
 AKKRVLEPLG LVEEPVKTAP GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD 180
 SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI 240
 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDFNRFHCH FSPRDWQRLI 300
 NNNWGFPRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG 360
 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF 420
 HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG 480
 PCYRQQRVSK TSADNNNNEF SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL 540
 IFGKQGSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV 600
 LPGMVWQDRD VYLQGIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT 660
 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSNNV DFTVDTNGVY 720
 SEPRPIGTRY LTRNL 735

SEQ ID NO 24

gccgccAccAUGG

SEQ ID NO 25

gccgccGccAUGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащая:

- а. элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-3, и
- б. элемент промоторной последовательности под SEQ ID NO 7.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п. о.) до 1500 п. о., содержащая:

а. элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше), в частности на 75% или больше, на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1-3, и

б. элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, где выделенная молекула состоит из одного и только одного из указанных элементов энхансерной последовательности, одного и только одного из указанных элементов промоторной последовательности и необязательно спейсера, отделяющего элемент энхансерной последовательности от элемента промоторной последовательности.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 и SEQ ID NO 15, или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 и SEQ ID NO 15, или состоящая из нее.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 11 или SEQ ID NO 13, или состоящая из нее, в частности

содержащая последовательность под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 13, или состоящая из нее.

6. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов.

7. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 6, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV), в частности где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12, более конкретно где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

8. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-7, дополнительно содержащий:

- a. последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- b. трансген.

9. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 8, где трансген содержит последовательность под SEQ ID NO 16.

10. Вирионная частица аденоассоциированного вируса, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-9.

11. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 или вектора экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса по п. 10, для применения в качестве лекарственного препарата.

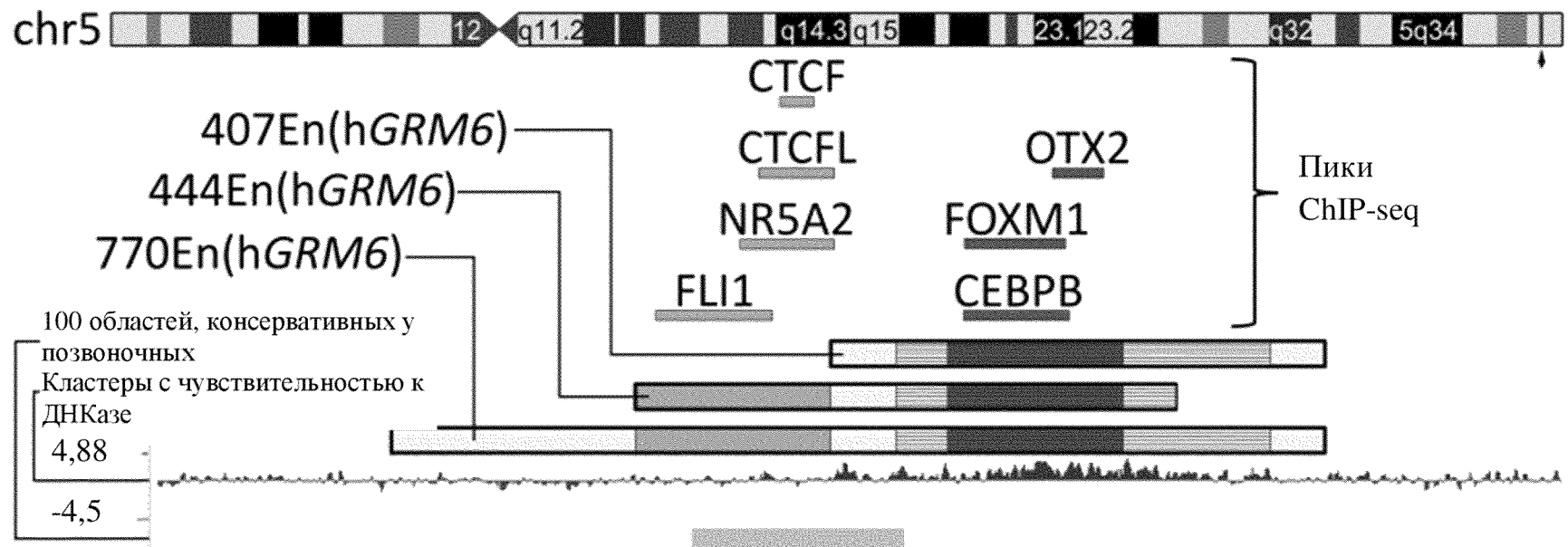
12. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса по п. 10, для применения в лечении врожденной стационарной ночной слепоты (CSBN1) или палочко-колбочковой и колбочко-палочковой дистрофий, в частности пигментного ретинита и макулярной дегенерации.

13. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса по п. 10, где средство вводится посредством:

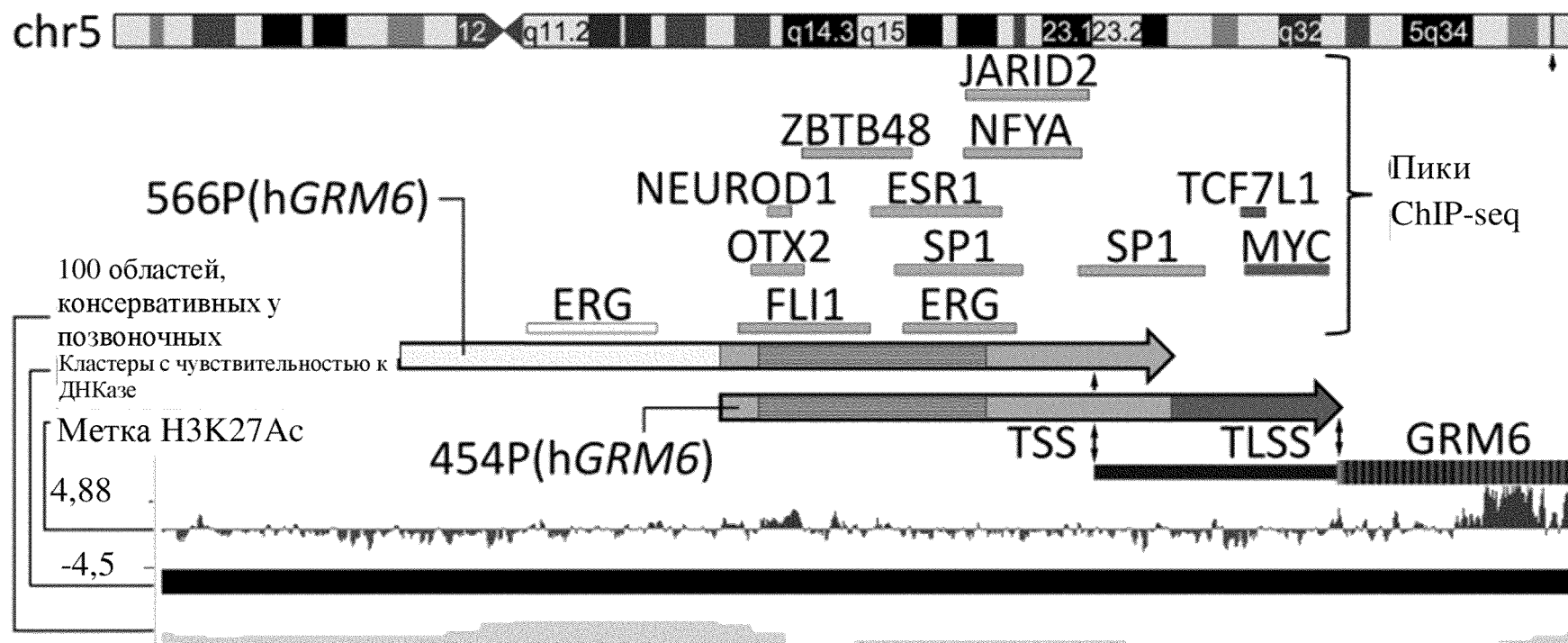
- a. интравитреального введения, в частности посредством интравитреальной инъекции, или посредством
- b. субретинальной инъекции.

По доверенности

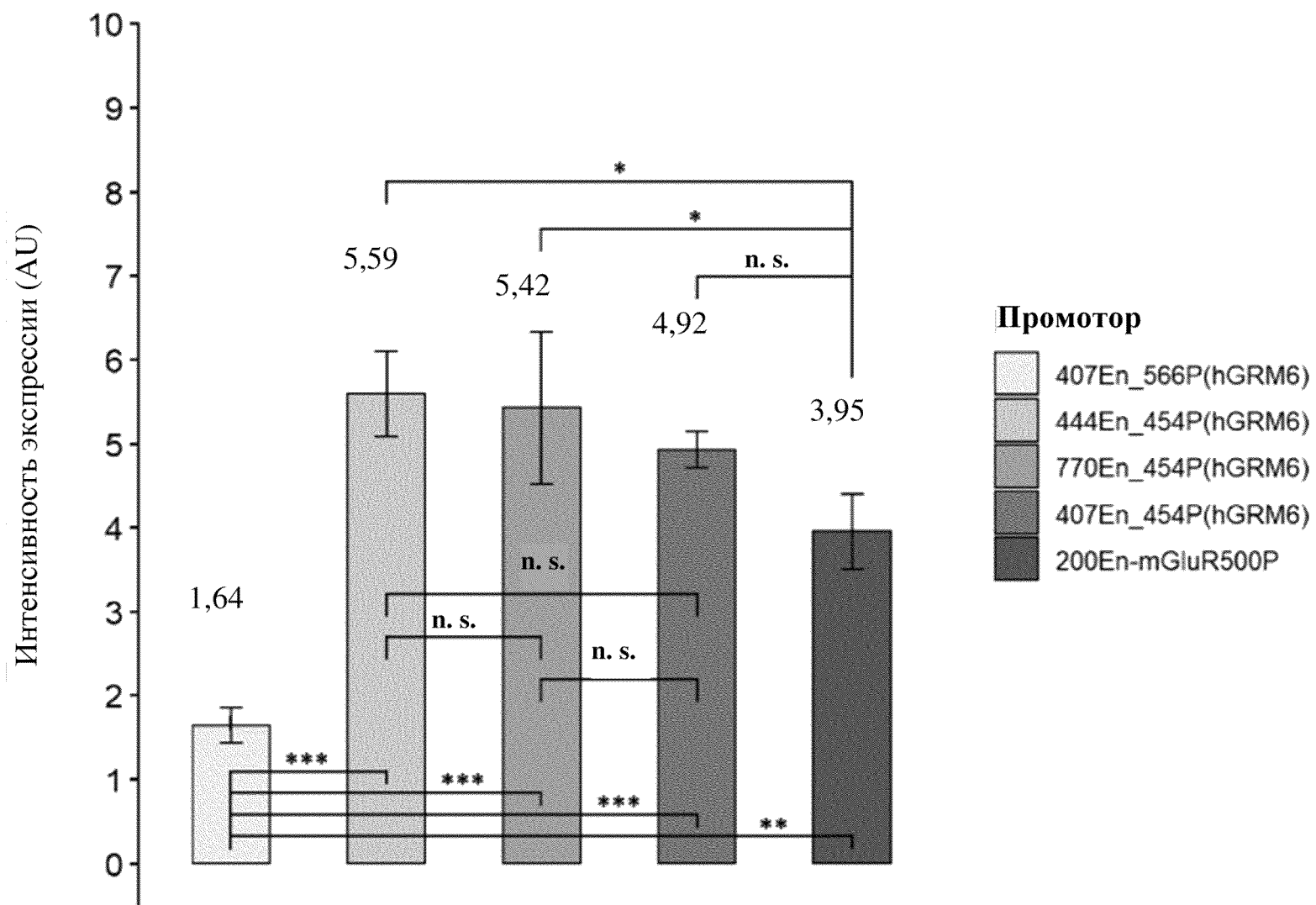
Фиг. 1А



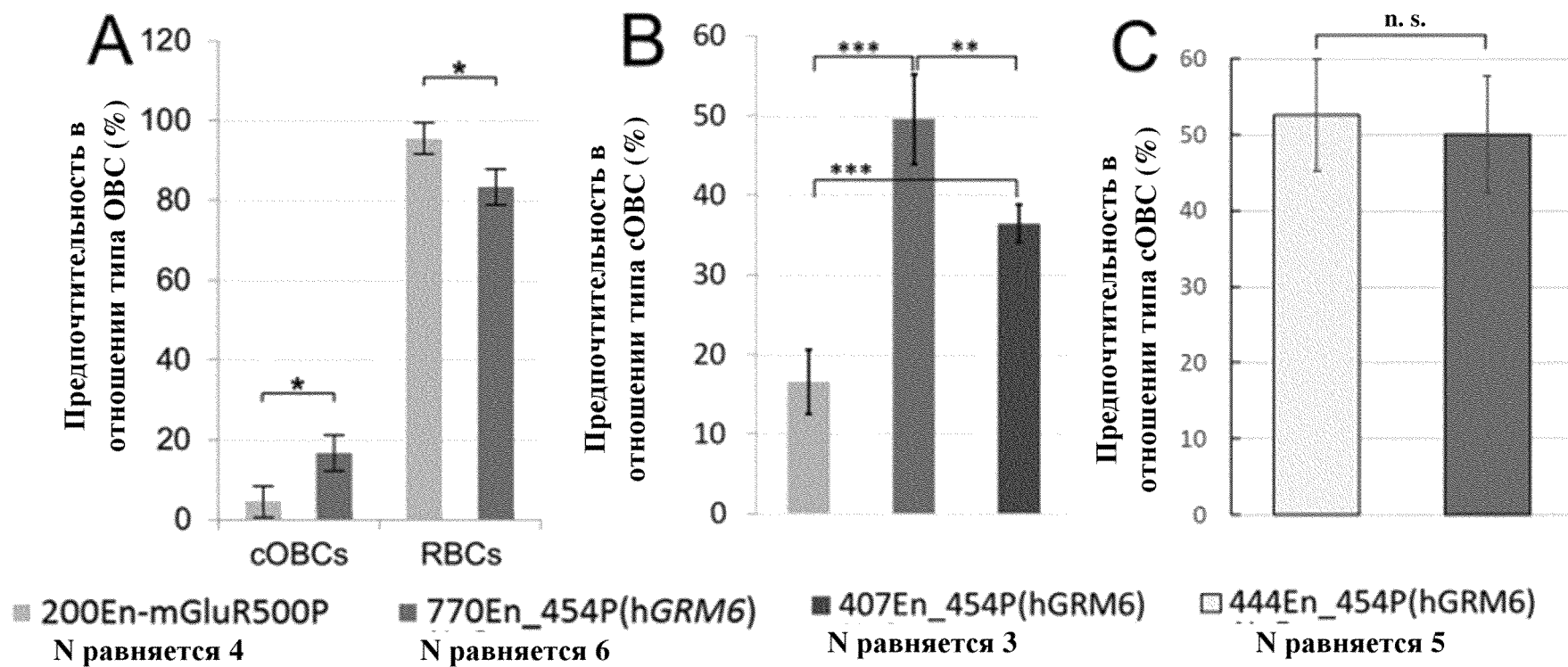
Фиг. 1В



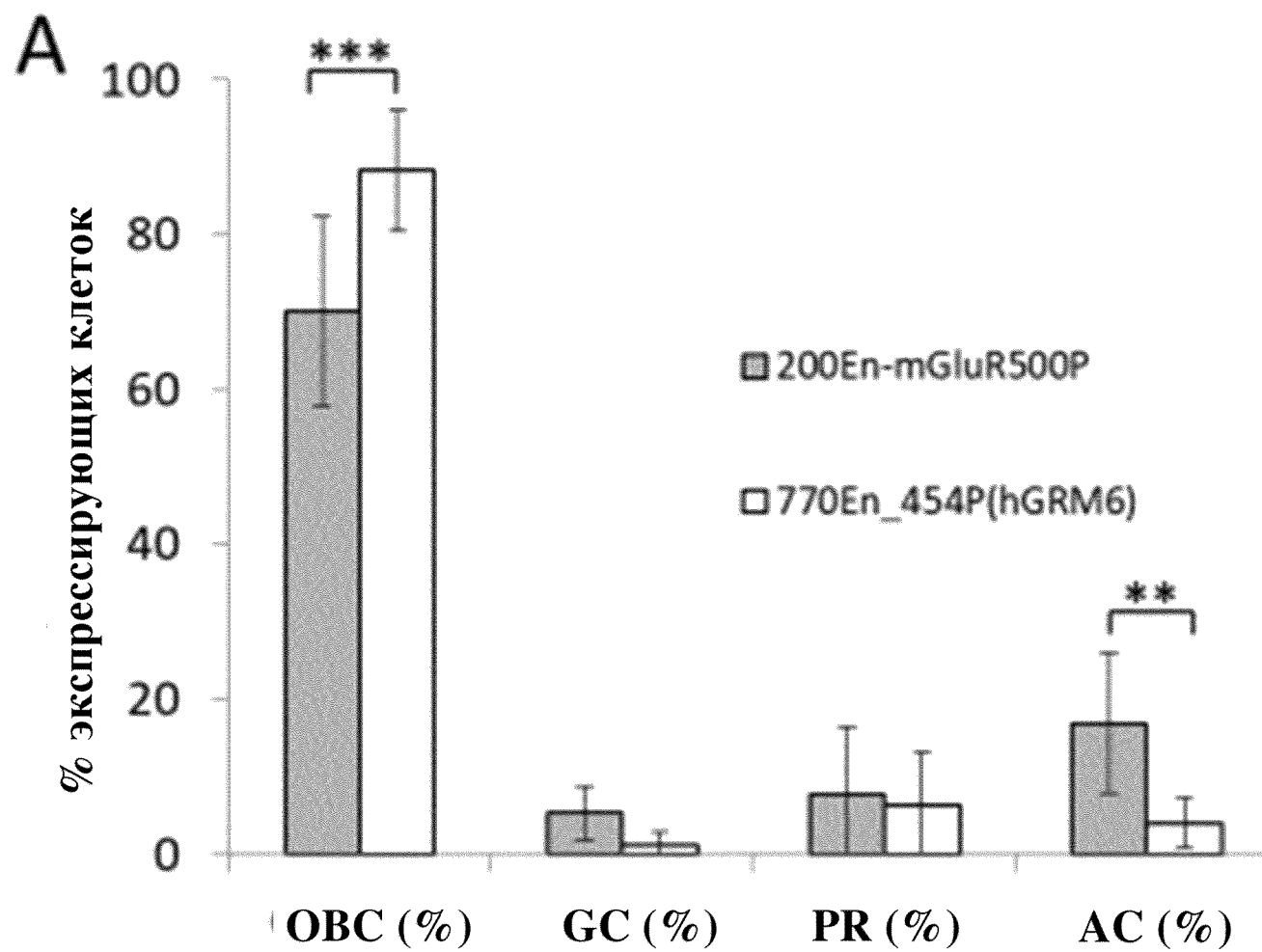
Фиг. 2



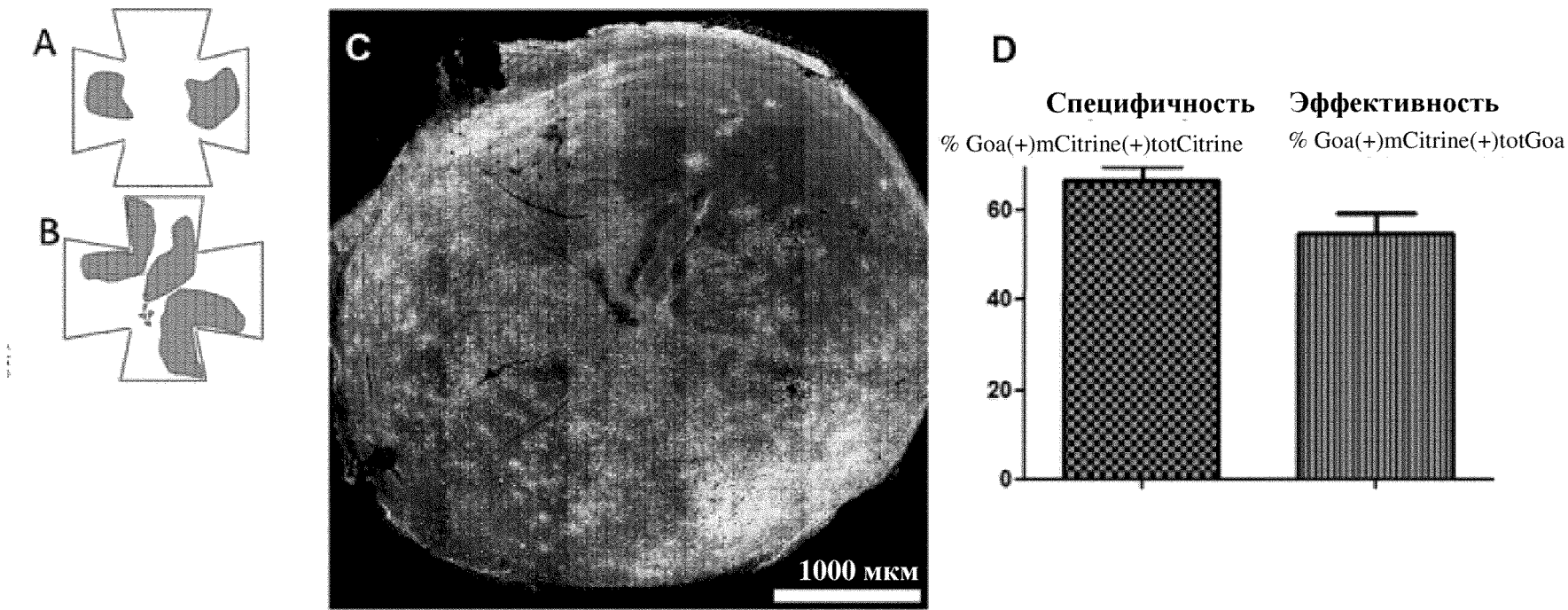
Фиг. 3



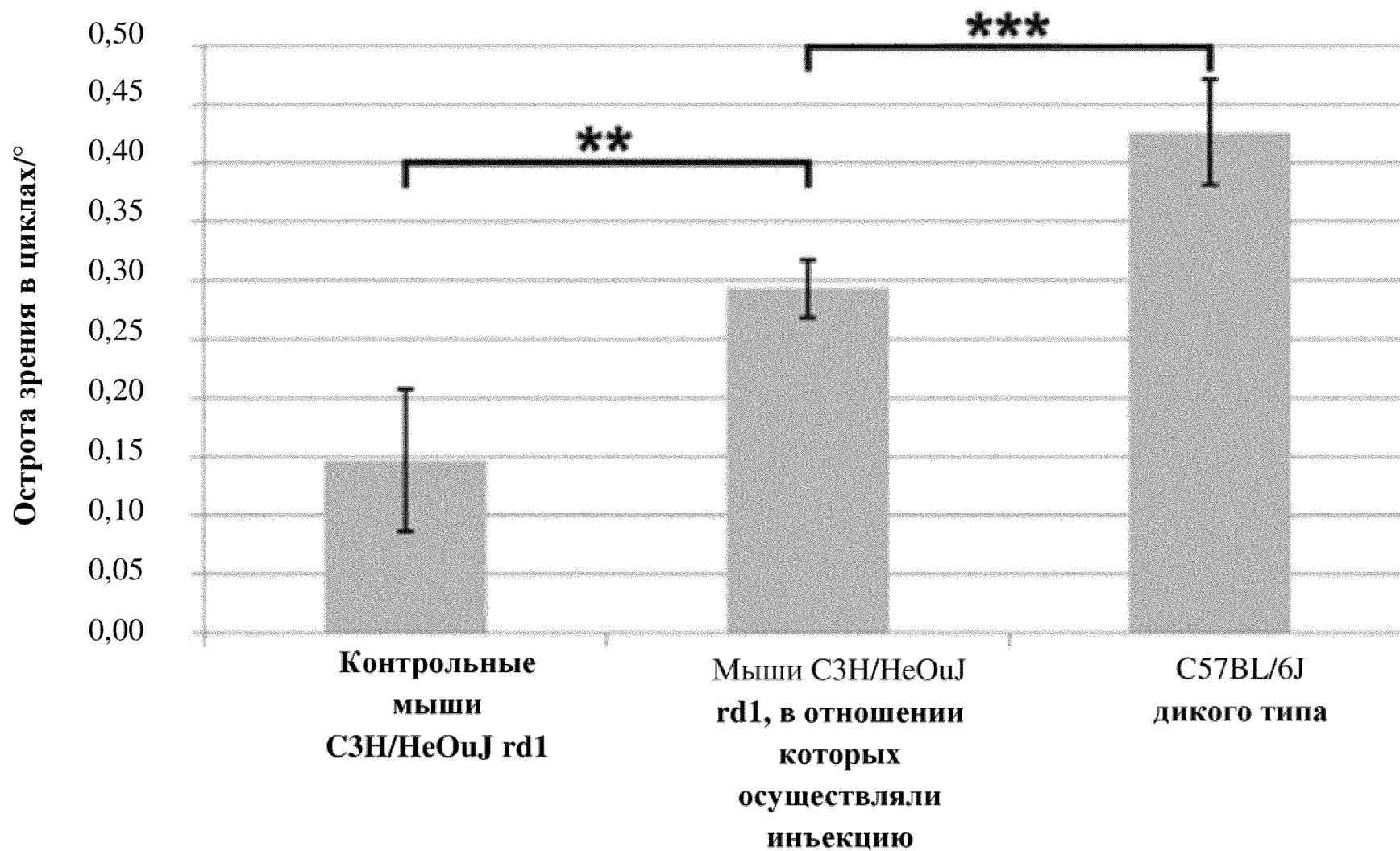
Фиг. 4



Фиг. 5

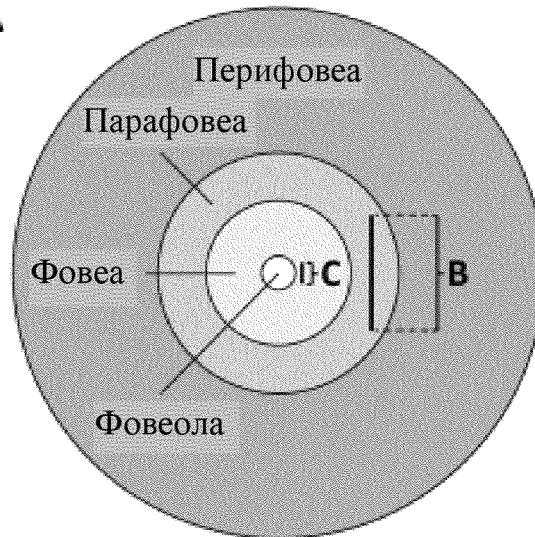


Фиг. 6

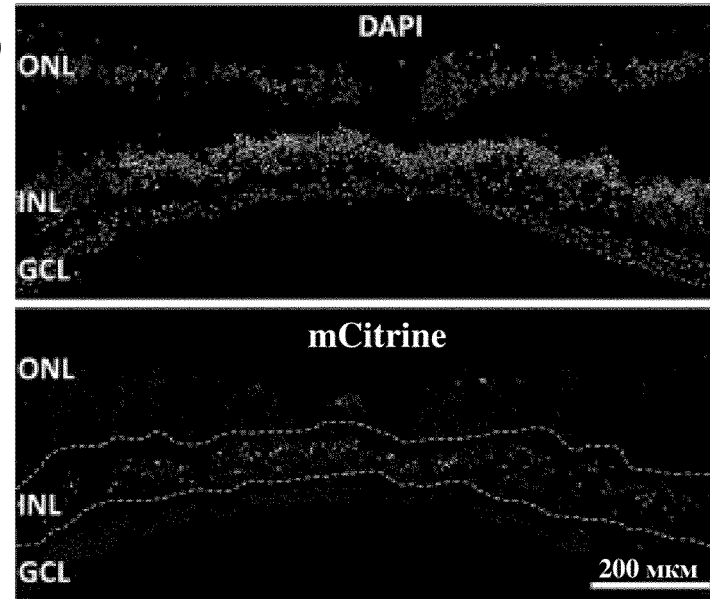


Фиг. 7

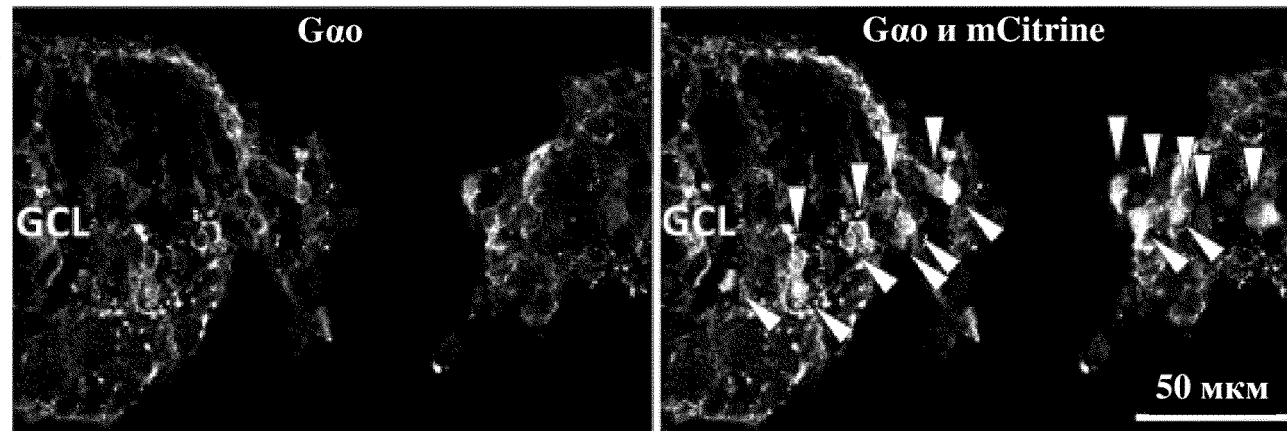
A



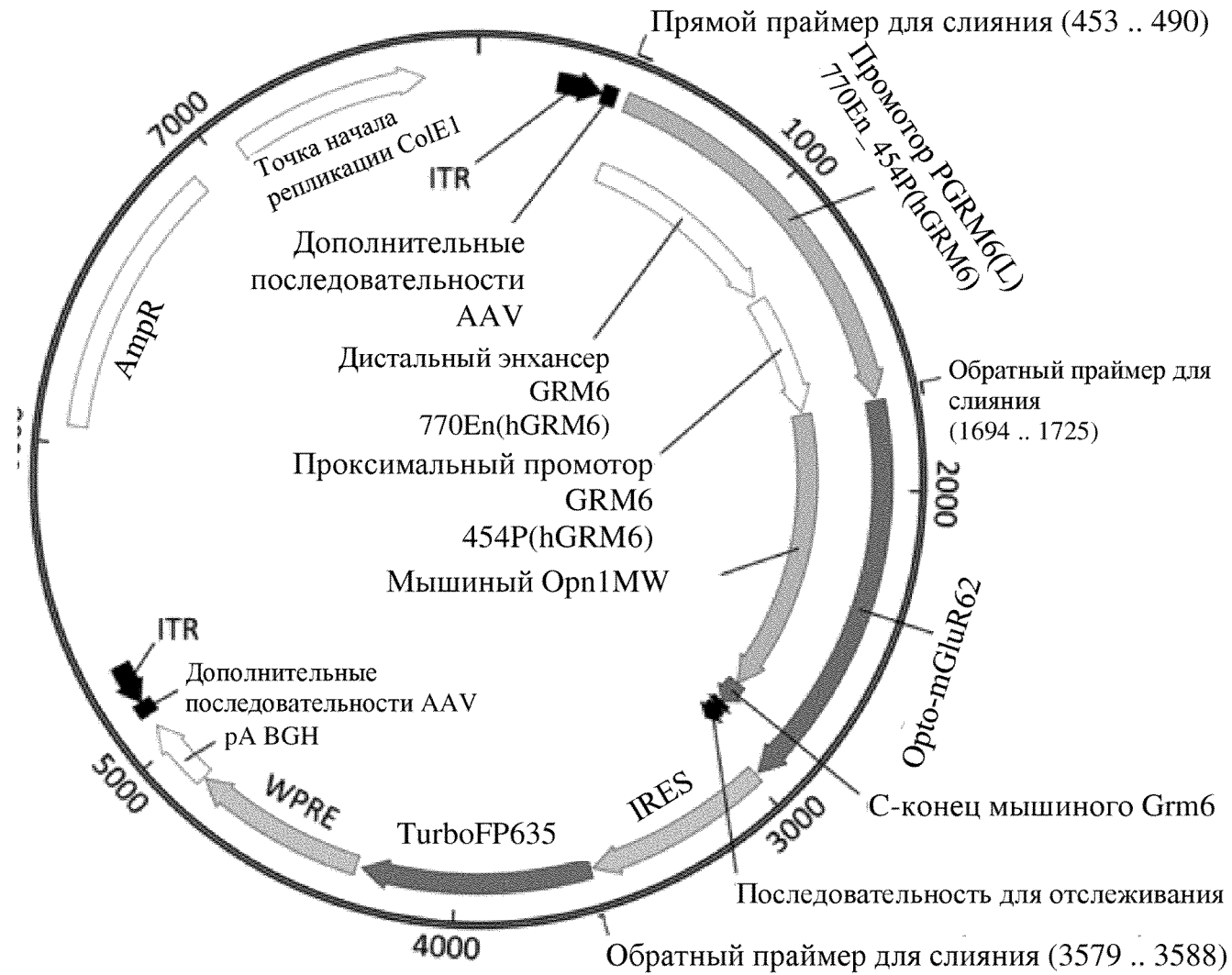
B



C



Фиг. 8



Фиг. 9

