(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292404 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.07

(22) Дата подачи заявки
2021.02.19

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕВОЗРАСТНЫХ НАРУШЕНИЙ СЛУХА У ЧЕЛОВЕКА

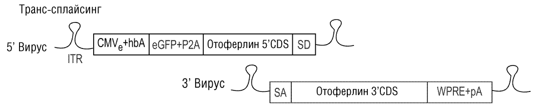
(31) **62/979,792**
(32) **2020.02.21**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/018919**
(87) **WO 2021/168362 2021.08.26**

(71) Заявитель:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Саймонс Эммануэль Джон, Нг Роберт (US)

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

(57) Предложены композиции, которые включают по меньшей мере два разных вектора нуклеиновых кислот, где каждый по меньшей мере из двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, и применение этих композиций для лечения потери слуха у субъекта.



202292404 A1

202292404 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575379EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕВОЗРАСТНЫХ НАРУШЕНИЙ СЛУХА У ЧЕЛОВЕКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/979,792, поданной 21 февраля 2020 г, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 21 февраля 2020 г, называется 2013615-0002_SL.txt и имеет размер 1298432 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее описание в целом относится к применению нуклеиновых кислот для лечения потери слуха у человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ухо представляет собой сложный орган, классически описываемый как включающий наружное ухо, среднее ухо, внутреннее ухо, слуховой (акустический) нерв и слуховую систему (которая обрабатывает звук по мере его прохождения от уха к мозгу). В дополнение к обнаружению звука, ухо также помогает сохранять равновесие. Таким образом, нарушения внутреннего уха могут вызывать потерю слуха, шум в ушах, головокружение и дисбаланс. Головокружение представляет собой галлюцинацию движения и представляет собой основной симптом заболевания вестибулярной системы. Головокружение может быть вызвано проблемами внутреннего уха или центральной нервной системы. Общие причины головокружения со стороны внутреннего уха включают: вестибулярный неврит (внезапную одностороннюю потерю вестибулярного аппарата), болезнь Меньера (эпизодическое головокружение), доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение (BPPV) и двустороннее нарушение вестибулярного аппарата. Общие причины головокружения со стороны центральной нервной системы включают: посткоммоционный синдром, шейное головокружение, вестибулярную мигрень, цереброваскулярное заболевание и акустическую невриному.

Потеря слуха является одним из наиболее распространенных сенсорных нарушений у человека и может возникать по многим причинам. Некоторые люди могут родиться с потерей слуха, в то время как другие могут терять слух медленно с течением времени. Пресбиакузис (также пишется пресбиакузис) представляет собой возрастную потерю слуха. Приблизительно 36 миллионов взрослых американцев сообщают о той или иной степени потери слуха, каждый третий человек старше 60 лет и половина людей старше 85 лет испытывают потерю слуха.

Потеря слуха может быть результатом факторов окружающей среды или комбинации генетических и экологических факторов. Около половины всех людей, у которых есть шум в ушах - фантомные шумы в их слуховой системе (звон, жужжание, чириканье, гудение или биение) - также имеют повышенную чувствительность или пониженную толерантность к определенным звуковым частотам и диапазонам громкости, известным как гиперакузия (также пишется как гиперакузия). Синдром Вильямса (также известный как синдром Вильямса-Берена) представляет собой мультисистемное нарушение, вызванное гемизиготной делецией 1,6 Мб области в 7q11.23, охватывающей около 26 генов, включая ген, кодирующий LIM киназу 1 (LIMK1). Индивидуумы с синдромом Вильямса проявляют гиперакузию и прогрессирующую потерю слуха, и раннее начало гиперакузии предполагает, что она может быть связана с одним из удаленных генов.

Экологические причины потери слуха включают определенные лекарства, определенные инфекции до или после рождения и воздействие громкого шума в течение длительного периода времени. Потеря слуха может быть вызвана шумом, ототоксичными агентами, пресбиакузией, болезнями, инфекциями или раком, которые поражают определенные части уха. Ишемическое повреждение может вызвать потерю слуха через патофизиологические механизмы, инициированные. В качестве другого примера, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED) характеризуется быстро прогрессирующей двусторонней сенсоневральной потерей слуха, возникающей, когда иммунная система организма атакует клетки внутреннего уха, которые ошибочно принимает за вирус или бактерию.

Приблизительно 1,5 из 1000 детей рождаются с глубокой потерей слуха, и еще от двух до трех из 1000 детей рождаются с частичной потерей слуха (Smith et al., 2005, Lancet 365:879-890). Более половины этих случаев относят к генетической основе (Di Domenico, et al., 2011, J. Cell. Physiol. 226:2494-2499).

Внесиндромная глухота представляет собой потерю слуха, не связанную с другими признаками и симптомами. Напротив, синдромная глухота представляет собой потерю слуха, которая возникает при аномалиях в других частях тела. Большинство случаев генетической глухоты (от 70% до 80 процентов) являются внесиндромными; остальные случаи вызваны специфическими генетическими синдромами.

Потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей из слухового прохода или среднего уха), нейросенсорной (возникающей из внутреннего уха или слухового нерва) или смешанной. Большинство форм внесиндромной глухоты связаны с постоянной потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота). Подавляющее большинство нейросенсорной потери слуха человека вызвано аномалиями волосковых клеток Кортиева органа в улитке. Существуют также очень необычные нейросенсорные нарушения слуха, которые затрагивают восьмой черепной нерв (преддверно-улитковый нерв) или слуховые отделы головного мозга. При самых редких из этих видов потери слуха поражаются только слуховые центры головного мозга. В этой ситуации может возникнуть корковая глухота, при которой звуки слышны с нормальным порогом, но качество воспринимаемого звука настолько низкое, что речь не может быть понята. Однако в большинстве случаев, нейросенсорная потеря слуха связана с нарушением функции волосковых клеток. Волосковые клетки могут быть аномальными при рождении или поврежденными в течение жизни человека. Существуют как внешние причины повреждений, такие как шумовая травма и инфекция, так и внутренние аномалии, такие как врожденные мутации генов, играющих важную роль в анатомии или физиологии улитки.

Потеря слуха, возникающая в результате изменений в среднем ухе, называется кондуктивной потеря слуха. Некоторые формы внесиндромной глухоты включают изменения как во внутреннем, так и в среднем ухе, что называется смешанной потерей слуха. Потеря слуха, которая присутствует до того, как ребенок научится говорить, классифицируется как доречевая или врожденная. Потеря слуха, возникающая после развития речи, классифицируется как послеречевая. Большинство аутосомно-рецессивных локусов вызывают доречевую потерю слуха от тяжелой до глубокой.

Внесиндромная глухота может иметь разные типы наследования и может возникать в любом возрасте. Типы внесиндромной глухоты названы в соответствии с характером их наследования. Аутосомно-доминантные формы обозначаются как DFNA, аутосомно-рецессивные формы обозначаются как DFNB, и X-сцепленные формы обозначаются как DFN. Каждый тип также нумеруется в том порядке, в котором он был описан. Например, DFNA1 был первым описанным аутосомно-доминантным типом внесиндромной глухоты.

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

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

От 1 до 2 процентов случаев демонстрируют X-сцепленный тип наследования, что означает, что мутировавший ген, ответственный за состояние, расположен на X-хромосоме (одной из двух половых хромосом). У мужчин с X-сцепленной внесиндромной глухотой, как правило, в более раннем возрасте развивается более серьезная потеря слуха, чем у женщин, которые наследуют копию той же мутации гена. Характерной чертой X-сцепленного наследования является то, что отцы не могут передать X-сцепленные признаки своим сыновьям.

Митохондриальная внесиндромная глухота, возникающая в результате изменений в митохондриальной ДНК, встречается менее чем в одном проценте случаев в Соединенных Штатах. Измененная митохондриальная ДНК передается от матери всем ее сыновьям и дочерям. Этот тип глухоты не передается по наследству от отцов.

Нарушение спектра слуховой нейропатии (ANSD), нарушение слуха, характеризующееся нормальной функцией наружных волосковых клеток и аномальной или отсутствующей слуховой реакцией ствола головного мозга, является одним из наиболее распространенных заболеваний, приводящих к слуховым и речевым коммуникативным барьерам у младенцев и детей младшего возраста. Приблизительно 10 процентов детей с постоянной потерей слуха могут иметь ANSD. Ген OTOF является первым геном, идентифицированным для аутосомно-рецессивного внесиндромного ANSD, и было обнаружено, что мутации в OTOF составляют примерно 5% всех случаев аутосомно-рецессивной внесиндромной потери слуха в некоторых популяциях (Rodriguez-Ballesteros et al. 2008 Human Mut 29(6):823-831).

Причины внесиндромной глухоты сложны. Исследователи идентифицировали более 30 генов, которые при изменении связаны с внесиндромной глухотой; однако некоторые из этих генов не были полностью охарактеризованы. Различные мутации в одном и том же гене могут быть связаны с различными типами потери слуха, и некоторые гены связаны как с синдромной, так и с внесиндромной глухотой.

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

Наиболее распространенной причиной потери слуха является внесиндромная потеря слуха и глухота, DFNB1 (также называемая связанной с GJB2 внесиндромной потерей слуха и глухотой DFNB1; аутосомно-рецессивной глухотой 1; нейросенсорной внесиндромной рецессивной глухотой 1). Внесиндромная потеря слуха и глухота (DFNB1) характеризуется врожденным, непрогрессирующим нейросенсорным нарушением слуха от легкой до глубокой степени. Это вызвано мутациями в GJB2 (который кодирует белок коннексин 26) и GJB6 (который кодирует коннексин 30). Диагностика DFNB1 зависит от молекулярно-генетического тестирования для выявления вызывающих глухоту мутаций в GJB2 и вышестоящих цис-регуляторных элементах, которые изменяют белок бета-2 щелевых контактов (коннексин 26). Молекулярно-генетическое тестирование GJB2 обнаруживает более 99% мутаций, вызывающих глухоту в этих генах. В отличие от некоторых других форм потери слуха, внесиндромная потеря слуха и глухота DFNB1 не влияет на равновесие или движение. Степень потери слуха трудно предсказать, исходя из того, какая у человека генетическая мутация. Даже если члены одной семьи страдают внесиндромной потерей слуха и глухотой, вызванной DFNB1, степень потери слуха у них может различаться.

Мутации в генах, кодирующих коннексин 26 (Cx26) и/или Cx30, связаны примерно с половиной всех случаев аутосомной внесиндромной доречевой глухоты у человека. Cx26 и Cx30 являются двумя основными изоформами Cx, обнаруженными в улитке, и они объединяются, образуя гибридные (гетеромерные и гетеротипические) щелевые контакты

(GJ) (Ahmad, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2007, 104(4):1337-1341). Внесиндромная потеря слуха и глухота, DFNA3, вызывается доминантно-негативным патогенным вариантом в гене GJB2 или GJB6, изменяющим либо белок коннексин 26 (Cx26), либо коннексин 30 (Cx30), соответственно, и характеризуется до- или послеречевым, от легкого до глубокого, прогрессирующим высокочастотным нейросенсорным нарушением слуха.

Связанная с OTOF глухота (внесиндромная потеря слуха DFNB9) характеризуется двумя фенотипами: доречевая внесиндромная потеря слуха и, реже, температурно-чувствительная внесиндромная слуховая нейропатия (TS-NSAN). Другая форма прогрессирующего нарушения слуха связана с мутацией гена отоферлина (например, мутацией I1573T или мутацией P1987R и/или мутацией E1700Q), или не является чувствительной к температуре.

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

Трансмембранная протеаза, серин 3, представляет собой фермент, кодируемый геном TMPRSS3 (также известным как DFNB10, DFNB8, ECHOS1 и TADG12). Ген был идентифицирован по его связи как с врожденной, так и с детской аутосомно-рецессивной глухотой. Мутации в TMPRSS3 связаны с послеречевым и быстро прогрессирующим нарушением слуха. Белок, кодируемый геном TMPRSS3, содержит домен сериновой протеазы, трансмембранный домен, домен, подобный рецептору LDL, и домен, богатый цистеином фагоцитарного рецептора. Известно, что сериновые протеазы участвуют во множестве биологических процессов, нарушения в работе которых часто приводят к заболеваниям и нарушениям человека. Этот ген экспрессируется в улитке плода и многих других тканях, и считается, что он участвует в развитии и поддержании внутреннего уха или содержимого перилимфы и эндолимфы. Этот ген был также идентифицирован как опухолеассоциированный ген, который сверхэкспрессируется в опухолях яичников. Описаны четыре варианта альтернативного сплайсинга, два из которых кодируют идентичные продукты.

Глухота DFN3 вызывается мутациями в гене POU3F4, расположенном на X-хромосоме. У людей с этим заболеванием, одна из маленьких костей среднего уха (стремя) не может нормально двигаться, что мешает слуху. Этот характерный признак DFN3 называется фиксацией стремени. По меньшей мере, четыре других участка X-хромосомы связаны с потерей слуха, но ответственные гены не обнаружены. DFNB59 (глухота, аутосомно-рецессивный 59), также известный как Pejvakin или PJVK, представляет собой белок из 352 аминокислот, принадлежащий к семейству гасдерминов у позвоночных. DFNB59 кодирован геном, который картируется на хромосоме 2q31.2 человека и необходим для правильного функционирования нейронов слухового пути и функционирования наружных волосковых клеток. Мутации в DFNB59, как полагают, вызывают внесиндромную нейросенсорную глухоту аутосомно-рецессивного типа 59, форму нейросенсорного нарушения слуха, характеризующуюся отсутствием или серьезной аномалией слуховой реакции ствола мозга, но нормальной отоакустической эмиссией (слуховая невропатия или слуховая диссинхрония). DFNB59 имеет значительное сходство с DFNA5, что указывает на то, что эти гены имеют общее происхождение.

Синдром Альпорта вызывается мутациями в генах COL4A3, COL4A4 и COL4A5, участвующих в биосинтезе коллагена. Мутации в любом из этих генов препятствуют правильному продуцированию или сборке сети коллагена IV типа, которая является важным структурным компонентом базальных мембран почек, внутреннего уха и глаза. Одним из критериев, используемых в диагностике синдрома Альпорта, является двусторонняя нейросенсорная потеря слуха в диапазоне от 2000 до 8000 Гц. Потеря слуха развивается постепенно, не проявляется в раннем младенчестве и обычно проявляется в возрасте до 30 лет.

Дефекты ионных каналов ассоциированы с глухотой: внесиндромная потеря слуха DFNA2 наследуется как аутосомно-доминантная мутация в гене KCNQ4, который кодирует член 4 подсемейства потенциалзависимых калиевых каналов KQT, также известный как субъединица потенциалзависимых калиевых каналов Kv7.4. Внесиндромная потеря слуха DFNA2 характеризуется симметричной, преимущественно высокочастотной нейросенсорной потерей слуха (SNHL), которая прогрессирует на всех частотах. В более молодом возрасте, потеря слуха имеет тенденцию быть легкой на низких частотах и умеренной на высоких частотах; у пожилых людей потеря слуха является умеренной на низких частотах и от тяжелой до глубокой на высоких частотах. Хотя нарушение слуха часто выявляют при обычной оценке слуха ребенка школьного возраста, вполне вероятно, что слух нарушен с рождения, особенно на высоких частотах. Большинству пострадавших людей первоначально требуются слуховые аппараты для усиления звука в возрасте от десяти до 40 лет. К 70 годам все люди с потерей слуха DFNA2 имеют нарушение слуха от тяжелой до глубокой степени.

Мутации в генах KCNE1 и KCNQ1 вызывают синдром Джервелла и Ланге-Нильсена (JLNS), тип синдрома удлиненного интервала QT, связанный с тяжелой двусторонней потерей слуха. Это состояние является аутосомно-рецессивным нарушением, которым страдают примерно от 1,6 до 6 на 1 миллион детей, и оно является причиной менее 10 процентов всех случаев синдрома удлиненного интервала QT. Он имеет заметно более высокую заболеваемость в Норвегии и Швеции, до 1:200000. Белки, продуцируемые генами KCNE1 и KCNQ1, работают вместе, образуя калиевый канал, который транспортирует положительно заряженные ионы калия из клеток. Движение ионов калия через эти каналы имеет решающее значение для поддержания нормальных функций внутреннего уха и сердечной мышцы.

Считается, что синдром EAST/SeSAME, характеризующийся умственной отсталостью, атаксией, судорогами, потерей слуха и почечной тратой солей, вызван мутациями в KCNJ10 калиевых каналах внутреннего выпрямления.

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

Мутации в гене ATP6V1B1, экспрессируемые как в почках, так и в улитке, связаны с ацидозом дистальных почечных канальцев (DRTA). Также было обнаружено, что у значительного процента детей с аутосомно-рецессивным DRTA наблюдается прогрессирующая двусторонняя нейросенсорная потеря слуха.

Синдром Ашера (также известный как синдром Халлгрена, синдром Ашера-Халлгрена, синдром дисакузии пигментного ретинита и синдром дизакузии дистрофии сетчатки) представляет собой редкое заболевание, вызванное мутацией в любом из, по меньшей мере, десяти генов, что приводит к сочетанию потери слуха и постепенного ухудшения зрения, и является основной причиной слепоглухоты. Потеря слуха вызвана дефектом внутреннего уха, тогда как потеря зрения является результатом пигментного ретинита (RP), дегенерации клеток сетчатки. Синдром Ашера имеет три клинических подтипа, обозначенных как I, II и III. Субъекты с синдромом Ашера I рождаются глубоко глухими и начинают терять зрение в первое десятилетие жизни, в детстве учатся медленно ходить из-за проблем в вестибулярной системе и испытывают трудности с равновесием. Субъекты с синдромом Ашера II не рождаются глухими, но имеют потерю слуха, но, похоже, не имеют заметных проблем с равновесием; они также начинают терять зрение позже (на втором десятилетии жизни) и могут частично сохранять зрение даже в среднем возрасте. Субъекты с синдромом Ашера III не рождаются глухими, но испытывают постепенную потерю слуха и зрения; они могут иметь или не иметь трудности с равновесием.

Мышиная модель врожденной глухоты была создана путем создания нулевой мутации в гене, кодирующем везикулярный транспортер глутамата-3 (VGLUT3). Недавно слух был восстановлен у мышей с нокаутом VGLUT3 с использованием вирусно-опосредованной генной терапии (Akil, et al., 2012, Neuron 75:283-293).

Math1 (гомолог ATH1 мыши); также известный как HATH1 или атональный гомолог дрозофилы (ATOH1) необходим для развития волосковых клеток во внутреннем ухе; таким образом, было предложено, чтобы Math1 действует как «ген про-волосковых клеток» в развивающемся сенсорном эпителии (Bermingham et al., 1999, Science 284:1837-1841). Несколько исследований в настоящее время продемонстрировали регенерацию волосковых клеток в поврежденной улитке мышей и улучшение как слуха, так и равновесия при вирусно-опосредованной доставке Math1 (Baker et al., 2009, Adv. Otorhinolaryngol. 66:52-63; Husseman and Raphael, 2009, Adv. Otorhinolaryngol. 66:37-51; Izumikawa et al., 2008, Hear. Res. 240:52-56; Kawamoto et al., 2003, J. Neurosci. 23:4395-

4400; Praetorius et al., 2010, Acta Otolaryngol. 130:215-222; Staecker et al., 2007, Otol. Neurotol. 28:223-231).

Мутации в гене WFS1 вызывают более 90 процентов случаев синдрома Вольфрама 1 типа; Синдром Вольфрама представляет собой состояние, поражающее многие системы организма, чаще всего характеризующееся высоким уровнем сахара в крови в результате нехватки гормона инсулина (сахарный диабет) и прогрессирующей потерей зрения из-за дегенерации нервов, передающих информацию от глаз к головному мозгу (атрофия зрительного нерва). Тем не менее, люди с синдромом Вольфрама часто также имеют дисфункцию гипофиза, что приводит к выделению избыточного количества мочи (несахарный диабет), потере слуха, вызванной изменениями во внутреннем ухе (нейросенсорная глухота), проблемам с мочевыводящими путями, уменьшению количества полового гормона тестостерона у мужчин (гипогонадизм) или неврологическим или психическим нарушениям. Около 65 процентов людей с синдромом Вольфрама имеют нейросенсорную глухоту, которая может варьироваться по степени тяжести от глухоты, начинающейся при рождении, до легкой потери слуха, начинающейся в подростковом возрасте, которая со временем ухудшается. Кроме того, примерно у 60 процентов людей с синдромом Вольфрама развиваются неврологическое или психическое нарушение, чаще всего проблемы с равновесием и координацией (атаксия), обычно начинающиеся в раннем взрослом возрасте.

Ген WFS1 кодирует белок под названием вольфрамин, который, как считается, регулирует количество кальция в клетках. Когда синдром Вольфрама вызван мутациями в гене WFS1, он наследуется по аутосомно-рецессивному типу, и функция белка вольфрамина снижена или отсутствует. В результате, уровень кальция в клетках не регулируется, и эндоплазматический ретикулум работает неправильно. Когда эндоплазматический ретикулум не имеет достаточного количества функционального вольфрамина, клетка запускает собственную клеточную гибель (апоптоз). Гибель клеток поджелудочной железы, особенно клеток, вырабатывающих инсулин (бета-клетки), вызывает сахарный диабет у людей с синдромом Вольфрама. Постепенная потеря клеток вдоль зрительного нерва в конечном итоге приводит к слепоте у пораженных людей. Гибель клеток в других системах организма, вероятно, вызывает различные признаки и симптомы синдрома Вольфрама 1 типа.

Было обнаружено, что мутации в митохондриальных генах MT-TS1 и MT-RNR1 увеличивают риск развития внесиндромной глухоты. Внесиндромная митохондриальная потеря слуха и глухота характеризуются потерей слуха от умеренной до глубокой. Патогенетические варианты MT-TS1 обычно связаны с началом нейросенсорной тугоухости в детстве. Патогенные варианты MT-RNR1 связаны с предрасположенностью к потере слуха, если они подвергаются воздействию определенных антибиотиков, называемых аминогликозидами (ототоксичность), и/или нейросенсорной тугоухости с поздним началом; однако у некоторых людей с мутацией в гене MT-RNR1 развивается потеря слуха даже без воздействия этих антибиотиков. Потеря слуха, связанная с ототоксичностью аминогликозидов, является двусторонней и тяжелой или глубокой, возникает в течение нескольких дней или недель после введения любого количества (даже разовой дозы) аминогликозидного антибиотика, такого как гентамицин, тобрамицин, амикацин, канамицин или стрептомицин.

Лечение потери слуха в настоящее время состоит из усиления слуха при потере слуха от легкой до тяжелой степени и кохлеарной имплантации при потере от тяжелой до глубокой степени (Kral and O'Donoghue, 2010, N. Engl. J. Med. 363:1438-1450). На сегодняшний день большинство исследований в этой области сосредоточено на регенерации волосковых клеток улитки, применимой к наиболее распространенным формам потери слуха, включая пресбиакузис, шумовое повреждение, инфекцию и ототоксичность.

В моделях кохлеарной ишемии на животных, ишемическое повреждение можно предотвратить с помощью таких соединений, как инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), AM-111 (ингибитор апоптоза), эдарабон (поглотитель свободных радикалов), гинзенозид RB 1 (Kappo), нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), BDNF, CNTF, SOD1, SOD2, некростатин-1, DFNA5 и MSRB3. Однако оказалось, что комбинация веществ может быть более эффективной, чем одно соединение (например, дополнительные методы лечения для модуляции окислительного стресса, экзотоксичности, кровотока, перегрузки кальцием и стимуляцией, путей апоптоза, механизмов нейротрофического или гормонального контроля).

Ингибирование апоптоза, индуцированного JNK-1 (митохондриально-индуцированного), может быть предотвращено такими соединениями, как доминантно-отрицательный JNK-1 и d-стероизомер JNK-1 (Mol. Pharmacol. 2007 March; 71(3):654-66; содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Сохраняется давняя потребность в агентах и способах профилактики или лечения глухоты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой типовое схематическое изображение генетической карты 5' и 3' векторов для двойной трансдукции AAV во внутренние волосковые клетки (IHC) с использованием подхода транс-сплайсинга. В 5' векторе энхансер CMV (CMVe) и промотор β-актина человека (hbA) управляют транскрипцией мРНК, кодирующей eGFP и пептид P2A, который расщепляется во время трансляции. 5' вектор также содержит кДНК, кодирующую N-концевую часть отоферлина, и донорный сайт сплайсинга (SD). Последовательность ДНК SD предоставлена Trapani et al. (2014) EMBO Mol Med **6** 194-211. В 3'-векторе акцепторный сайт сплайсинга (SA) субклонирован после первого инвертированного концевого повтора (ITR) и перед 3' частью кодирующей последовательности отоферлина. Затем следуют стабилизирующие последовательности мРНК, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) и сигнал полиаденилирования (pA).

Фигура 2 представляет собой типовое схематическое изображение генетической карты 5' и 3' векторов для двойной трансдукции AAV в IHC с использованием гибридного подхода. В дополнение к элементам, описанным на фигуре 1, высоко рекомбиногенные последовательности из последовательностей фага F1 (AK) включены на 3' конце '5 вектора и на 5' конце 3' вектора, чтобы обеспечить правильную сборку вектора (Trapani et al. (2014) EMBO Mol Med 6 194-211).

Фигура 3 представляет собой график, показывающий амплитуду слуховых ответов ствола мозга (ABR) в течение времени у не трансдуцированных мышей $Otof^{-/-}$ (n=25; тонкая черная линия) и *мышей Otof* $^{-/-}$ после двойной AAV-опосредованной экспрессии отоферлина (n=14; серые линии представляют отдельных животных, толстая черная линия представляет собой средний ответ по всем животным).

Фигура 4 представляет собой график, показывающий амплитуду ABR в течение времени у не трансдуцированных мышей $Otof^{-/-}$ (n=25; длинная пунктирная линия), мышей $Otof^{-/-}$ после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина (n=14; короткая пунктирная линия) и мышей $Otof^{wt/wt}$ после двойного AAV с усиленной трансдукцией зеленого флуоресцентного белка (eGFP) (n=5; тонкие черные линии представляют отдельных животных, толстая черная линия представляет собой среднюю амплитуду по всем животным).

Фигура 5 представляет собой типовой график, показывающий пороговое значение ABR (в дБ SPL) в зависимости от частоты (в кГц) в ответ на чистые тона или щелчки. Минимальный уровень звукового давления (SPL), при котором могут быть обнаружены волны, отображается для отдельных $Otof^{-/-}$ животных с экспрессией отоферлина, опосредованной двойным AAV (белые кружки представляют отдельных животных, кружок с диагональной заливкой представляет собой средний порог для всех животных), для не трансдуцированных животных $Otof^{-/-}$ (черные кружки) и для животных $Otof^{wt/wt}$ после двойного AAV с трансдукцией eGFP (кружки с клетчатой заливкой) в ответ на чистые тона или щелчки.

Фигура 6 представляет собой график, показывающий скорость трансдукции IHC вдоль улитки (например, всего кортиева, апикального поворота и срединно-базального/базального поворота), определенную иммуногистохимией с использованием двух разных антител, одно из которых связывает N-концевой фрагмент отоферлина, и другое связывает с самой C-концевой частью отоферлина.

Фигура 7 представляет собой набор иммуногистохимических изображений одного кортиева органа мыши $Otof^{-/-}$ после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина. Кальбиндин используют в качестве маркера для внутренних и наружных волосковых клеток. Клетки, экспрессирующие eGFP, указывают на вирусную трансдукцию, по меньшей мере, 5' вируса. На левой и средней панелях показано окрашивание антителом против отоферлина (Abcam) в N-концевой половине отоферлина. На правой панели показано окрашивание C-конца антителом против отоферлина (Synaptic Systems). Вместе все три панели демонстрируют, что полноразмерный отоферлин экспрессируется в IHC. Важно отметить, что, несмотря на то, что AAV трансдуцируют несколько типов клеток в кортиевом органе (на что указывает флуоресценция eGFP), экспрессия отоферлина ограничена внутренними волосковыми клетками. Масштабная линейка: 100 мкм.

Фигура 8 представляет собой график, показывающий токи Ca^{2+} в ответ на деполяризационный стимул для Otof$^{-/-}$ IHC (белый; n=10), Otof$^{-/-}$ IHC после опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина (диагональная линия; n=8) и IHC дикого типа от фоновых аналогичных контрольных животных (черный; n=6).

Фигура 9 представляет собой график, показывающий емкость плазматической мембраны (ΔC_m) в зависимости от продолжительности деполяризации в трансдуцированных двойным AAV IHC мышей Otof$^{-/-}$ (черная линия, отдельные IHC; ромб с диагональной заливкой: среднее значение ± с.о.с.; n=8), два отдельных трансдуцированных двойным AAV IHC инъецированных мышей Otof$^{-/-}$ (пунктирная линия), которые демонстрируют лишь незначительные количества экзоцитоза, и аналогичные по фону контроли дикого типа (черные ромбы; n=6). Данные для дикого типа из Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535 показаны черными кружками для сравнения.

Фигура 10 представляет собой типовой график, показывающий Qreal в зависимости от продолжительности деполяризации (мс) в IHC Otof$^{-/-}$ (белый ромб), трансдуцированных двойным AAV IHC мышей Otof$^{-/-}$ (черный кружок) и контролей дикого типа с аналогичным фоном (черный ромб).

Фигура 11 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB.

Фигура 12 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-SA-3'mOTOF-EWB.

Фигура 13 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD.

Фигура 14 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK.

Фигура 15 представляет собой график, показывающий емкость плазматической мембраны (ΔCm) в зависимости от продолжительности деполяризации в IHC мышей Otof$^{-/-}$, трансдуцированных двумя векторами, показанными на фигуре 2 (средняя заливка; толстая линия), IHC мышей дикого типа (темная заливка; линия средней толщины) и IHC мышей Otof$^{-/-}$.

Фигура 16 представляет собой типовой график, показывающий Qreal в зависимости от продолжительности деполяризации (мс) в IHC Otof$^{-/-}$ (белый ромб), IHC мышей Otof$^{-/-}$, трансдуцированных двумя векторами, показанными на фигуре 2 (серые ромбы), и IHC аналогичных по фону контролей дикого типа (черный ромб).

Фигура 17 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB.

Фигура 18 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-HBA-eGFP-P2A-

5'mOTOF-SD.

Фигура 19 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK.

Фигура 20 представляет собой типовую плазмидную карту pAAV-SA-3'mOTOF-EWB.

Фигура 21 представляет собой типовую схему части pAKOS102 (SEQ ID NO: 43).

Фигура 22 представляет собой типовую схему части pAKOS103 (SEQ ID NO: 44).

Фигура 23 представляет собой типовую схему части pAKOS103.

Фигура 24 представляет собой типовую карту плазмиды pAKOS104 (SEQ ID NO: 45).

Фигура 25 представляет собой типовую схему части pAKOS104-DHFR (SEQ ID NO: 46).

Фигура 26 представляет собой типовую схему части pAKOS104-DHFR.

Фигура 27 представляет собой типовую схему части pAKOS105 (SEQ ID NO: 47).

Фигура 28 представляет собой типовую схему части pAKOS105.

Фигура 29 представляет собой типовую схему части pAKOS105_GFP (SEQ ID NO: 48).

Фигура 30 представляет собой типовую схему части pAKOS106 (SEQ ID NO: 49).

Фигура 31 представляет собой типовую схему части pAKOS106.

Фигура 32 представляет собой типовую схему части pAKOS107 (SEQ ID NO: 50).

Фигура 33 представляет собой типовую схему части pAKOS107.

Фигура 34 представляет собой типовую схему части pAKOS108 (SEQ ID NO: 51).

Фигура 35 представляет собой типовую схему части pAKOS108.

Фигура 36 представляет собой типовую схему части pAKOS109 (SEQ ID NO: 52).

Фигура 37 представляет собой типовую схему спейсера фактора VIII (SEQ ID NO: 54-57).

Фигура 38 представляет собой типовую схему p109 (SEQ ID NO: 84).

Фигура 39 представляет собой типовую схему p105 (SEQ ID NO: 85).

Фигура 40 представляет собой типовую схему 105.WPRE.

Фигура 41 представляет собой типовую схему p108.

Фигура 42 представляет собой типовую схему 1OTOF18.CL1.

Фигура 43 представляет собой типовую схему 19OTOF48.

Фигура 44 представляет собой типовую схему 1OTOF20.CL1.

Фигура 45 представляет собой типовую схему 21OTOF48.WPRE.

Фигура 46 представляет собой типовую схему 1OTOF21.CL1.

Фигура 47 представляет собой типовую схему 22OTOF48.WPRE.

Фигура 48 представляет собой типовую схему 105.pA.NTF3.CMVd.

Фигура 49 представляет собой иммуноблот, показывающий экспрессию полноразмерного отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных различными парами указанных плазмид.

Фигура 50 представляет собой таблицу, показывающую количественную оценку экспрессии полноразмерного отоферлина человека из трех повторов эксперимента, описанного на фигуре 49.

Фигура 51 представляет собой график порога щелчка ABR у мышей дикого типа, не получавших лечение вектором, или у мышей $Otof^{-/-}$, не получавших лечение вектором или получавших лечение векторами DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и p109). Слух у мышей $Otof^{-/-}$, которым вводили векторы DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и 109), измеряют через 26-28 дней и через 91 день после лечения.

Фигура 52 представляет собой график порога тональной посылки ABR у мышей дикого типа, не получавших лечение вектором, или у мышей $Otof^{-/-}$, не получавших лечение вектором или получавших лечение векторами DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и p109). Слух у мышей $Otof^{-/-}$, которым вводили векторы DualAAV Anc80.hOtof (векторы p105 и 109), измеряют через 26-28 дней и через 91 день после лечения.

Фигура 53 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD (SEQ ID NO: 87).

Фигура 54 представляет собой типовую схему части pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE (SEQ ID NO: 88).

Фигура 55 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF.SD-AK.

Фигура 56 представляет собой типовую схему части pAAV-AK-SA-3'mOTOF.WPRE.

Фигура 57 представляет собой типовую схему части pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK.

Фигура 58 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP.

Фигура 59 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AK.

Фигура 60 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD-AK.

Фигура 61 представляет собой типовую схему части pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD.

Фигура 62 представляет собой типовую схему части pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD.

Фигура 63 представляет собой типовую схему части pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD-AK.

Фигура 64 представляет собой типовую схему части pAAV-CBA-5'hOTOFcodop-SD-AK.

Фигура 65 представляет собой типовую схему части pAAV-CBA-5'hOTOF-SD.

Фигура 66 представляет собой типовую схему части pAAV-SA-3'OTOF.

Фигура 67 представляет собой типовую схему части pAAV-AP-SA-3'OTOF.

Фигура 68 представляет собой типовую схему части pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop.

Фигура 69 представляет собой типовой иммуноблот, показывающий экспрессию полноразмерного отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных с использованием реагента для трансфекции ДНК jetPRIME® (polyplus) с 600 нг различных пар указанных плазмид. Трек 1 содержит предварительно окрашенную белковую лестницу. Трек 2 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAKOS104 (как показано на фигурах 24 и 59) и вектором pAKOS105 (как показано на фигурах 27, 28 и 39). Трек 3 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAKOS108 (как показано на фигурах 34, 35, 41 и 57) и вектором pAKOS105 (как показано на фигурах 27, 28 и 39). Трек 4 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAKOS109 (как показано на фигурах 36 и 38) и вектором pAKOS105 (как показано на фигурах 27, 28 и 39). Трек 5 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на фигуре 60) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на фигуре 68). Трек 6 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAAV-CMV-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на фигуре 63) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на фигуре 68). Трек 7 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAAV_CBA-5'hOTOFcodop-SD-AK (как показано на фигуре 64) и вектором pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop (как показано на фигуре 68). Трек 8 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAKOS102 (как показано на фигуре 21) и вектором pAKOS103 (как показано на фигурах 22, 23 и 66). Трек 9 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором CBA.TS и вектором pAKOS103 (как показано на фигурах 22, 23 и 66). Трек 10 содержит образец белка клеток HEK293FT, трансфицированных вектором pAKOS106 (как показано на фигурах 30, 31 и 58) и pAKOS107 (как показано на фигурах 32, 33 и 67). Через 96 часов после трансфекции клетки собирают и лизируют с использованием буфера RIPA и анализируют в 4-12% геле белка Bolt, который затем переносят на нитроцеллюлозную мембрану. Отоферлин человека выявляют с помощью анти-OTOF поликлонального антитела (Thermo PA5-52935). Бета-актин человека используют в качестве основного антитела для внутреннего контроля нагрузки между треками. Эксперимент повторяют в трехкратном повторе. Относительные количественные измерения для каждого эксперимента представлены в иммуноблоте вместе со средним значением и стандартным отклонением (STDEV).

Фигура 70 представляет собой иммуноблот, показывающий экспрессию полноразмерного отоферлина человека в клетках HEK293FT, трансфицированных различными парами плазмид, указанными при различной множественности инфекций (MOI). Клетки HEK293FT высевают в течение ночи в количестве $4x10^4$ клеток/лунку на 96-луночный планшет. Через шесть часов после посева, в каждую лунку добавляют двойные векторы. Через 96 часов после трансфекции, клетки собирают и лизируют с использованием буфера RIPA и анализируют в 4-12% геле белка Bolt, который затем переносят на нитроцеллюлозную мембрану. Отоферлин человека выявляют с помощью анти-OTOF поликлонального антитела (Thermo PA5-52935). Бета-актин человека используют в качестве основного антитела для внутреннего контроля нагрузки между треками. Трек 1: CBA.OTOF(AK) с MOI 503000; трек 2: CBA.OTOF(AK) с MOI 1510000; трек 3: CBA.OTOF(AK) с MOI 100000; трек 4: CBA.OTOF(AK) с MOI 303000; трек 5: CMV.OTOF(AK) с MOI 638000; трек 6: CMV.OTOF(AK) с MOI 1910000; трек 7: CMV.OTOF(AK) с MOI 127000; трек 8: CMV.OTOF(AK) с MOI 382000; трек 9: отрицательный контроль.

Фигура 71 представляет собой набор иммуногистохимических изображений одного кортиевого органа мыши Otof-/- в возрасте P17 после одностороннего внутрикохлеарного введения двойных AAV векторов, экспрессирующих CBA.hOTOF(AK) (векторы p105 и 109). Ипсилатеральную улитку рассекают и анализируют на экспрессию белка с помощью иммуногистохимии в трех различных частотных областях (основание - вершина).

Фигура 72 представляет собой график, показывающий долю N- и C-концевых меченных отоферлином внутренних волосковых клеток (IHC) у инъецированных двойным AAV-TS (n=10 мышей) и двойным AAV-Hyb (n=9 мышей) мышей CD1B6F1-Otof$^{-/-}$ (возраст P18-P30). Отдельные животные изображены открытыми символами. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (с.о.с.), ns P>0,05; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001, знаковый ранговый критерий Уилкоксона для совпадающих пар и непарный t-критерий с поправкой Уэлча.

Фигура 73 представляет собой график, показывающий средние уровни N-концевой и C-концевой иммунофлуоресценции отоферлина в трансдуцированных двойным AAV внутренних волосковых клетках Otof$^{-/-}$ и дикого типа (IHC) мышей (в возрасте P23-30). Уровни отоферлина нормализуют к уровням иммунофлуоресценции в не трансдуцированных IHC B6 дикого типа для каждого антитела отдельно. Внутри столбцов указано количество подсчитанных IHC. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (с.о.с.), ns P>0,05; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001, критерий Крускала-Уоллиса с последующим критерием множественных сравнений Данна.

Фигура 74 представляет собой график, показывающий число синаптических лент, количественно определенное из внутренних волосковых клеток (IHC) в апикальных поворотах улитки дикого типа (B6: n= 48 IHC, CD1B6F1: n= 108 IHC), трансдуцированных Otof$^{-/-}$ (dualAAV-TS: n=59 IHC, dualAAV-Hyb: n=37 IHC) и не трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC из инъецированного (инъецированного -AAV уха, n=65 IHC) и контралатерального не инъецированного (не инъецированного -AAV уха, n=46 IHC) ушей (от мышей в возрасте P25-P29. Отдельные животные показаны незаштрихованными символами. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (с.о.с.), ns P>0,05, **P≤0,001 (Критерий Крускала-Уоллиса с последующим критерием множественных сравнений Данна).

Фигура 75 представляет собой график, показывающий количества синапсов, определенные количественно из внутренних волосковых клеток (IHC) в апикальных поворотах (c) B6 дикого типа (P6: n=53 IHC; P14: n=73 IHC) и B6 Otof$^{-/-}$ (P6: n=62 IHC; P14: n=65 IHC) мышей на двух разных стадиях развития (P6 и P14). Отдельные животные показаны открытыми символами. Данные показаны как среднее ± стандартная ошибка среднего (с.о.с.), ns P>0,05, **P≤0,001 (критерий Крускала-Уоллиса с последующим критерием множественных сравнений Данна).

Фигура 77 представляет собой график, показывающий суммарные амплитуды волны I-V слухового ответа ствола головного мозга (ABR) отдельных, леченных двойным-AAV-TS животных CD1B6F1 Otof$^{-/-}$ (n=8 животных; из фигуры 76), нанесенные на график относительно скорости трансдукции их внутренней волосковой клетки (IHC) с полноразмерным отоферлином (из фигуры 5, C-концевой отоферлин). r: коэффициент корреляции=8 мышей, =AAV: n=38 мышей). Отдельные животные изображены открытыми символами. r≥0,5 положительная корреляция (уровень звукового давления 70 децибел (дБ SPL) и 90 дБ SPL: корреляционный тест Пирсона; 50 дБ SPL: корреляционный тест Спирмена).

Фигура 78 представляет собой схему типовой двойной векторной системы AAV по настоящему описанию, которая включает в себя «восходящие» и «нисходящие» векторы (AKhOTOF5 и AChOTOF3, соответственно).

Фигура 79 представляет собой схему «восходящего» вектора AKhOTOF5.

Фигура 80 представляет собой схему «нисходящего» вектора AChOTOF3.

Фигура 81 представляет собой вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо в соответствии с аспектами настоящего описания.

Фигура 82 представляет собой вид сбоку узла изогнутой иглы в соответствии с аспектами настоящего изобретения.

Фигура 83 представляет собой вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо в соответствии с аспектами настоящего описания.

Фигура 84 представляет собой вид в перспективе узла изогнутой иглы, соединенного с дистальным концом устройства, в соответствии с аспектами настоящего описания.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание основано на открытии того, что композиция, включающая, по меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот, где каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, может быть использована для создания последовательности, кодирующей активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин) в клетке млекопитающего, и тем самым лечить внесиндромную нейросенсорную потерю слуха у субъекта, нуждающегося в этом.

В настоящем документе предложены композиции, которые включают, по меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот, где: каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов включает кодирующую последовательность, кодирующую разные части белка отоферлина, где каждая из кодируемых частей содержит, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков в длину, где аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей; ни один из, по меньшей мере, двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин; по меньшей мере, одна из кодирующих последовательностей включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами; и при введении в клетку млекопитающего, по меньшей мере, два разных вектора подвергаются конкатемеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, в результате чего образуется рекомбинированная нуклеиновая кислота, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, каждый из, по меньшей мере, двух различных векторов представляет собой плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, каждый из, по меньшей мере, двух различных векторов представляет собой искусственную хромосому человека (HAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC), искусственную хромосому бактерий (BAC) или искусственную хромосому, полученную из P1 (PAC). В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, каждый из, по меньшей мере, двух различных векторов представляет собой вирусный вектор, выбранный из вектора аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусного вектора, лентивирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, каждый из, по меньшей мере, двух различных векторов представляет собой вектор AAV.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, векторы включают два разных вектора, каждый из которых включает другой сегмент интрона, где интрон включает нуклеотидную последовательность интрона, которая присутствует в геномной ДНК отоферлина, и где два разных сегмента перекрываются, по меньшей мере, на 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, два разных сегмента перекрываются по последовательности на от примерно 100 до примерно 800 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере, двух различных векторов имеет длину от примерно 500 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, нуклеотидная последовательность каждого из по меньшей мере, двух различных векторов имеет длину от 500 нуклеотидов до 5000 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе количество разных векторов в композиции равно двум. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый из двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, длина N-концевой части белка отоферлина составляет от 30 аминокислот до 1600 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, длина N-концевой части белка отоферлина составляет от 200 аминокислот до 1500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый вектор дополнительно включает один или оба из промотора и последовательности Козака. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый вектор включает промотор, который является индуцируемым промотором, конститутивным промотором или тканеспецифическим промотором.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 39 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 39), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 40 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 41 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 41), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 42 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, один из двух векторов содержит SEQ ID NO: 84 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 84), и второй из двух векторов содержит SEQ ID NO: 85 (или содержит последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO: 85).

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый вектор дополнительно включает кодирующую последовательность, кодирующую домен дестабилизации, где домен дестабилизации находится на 3' конце кодирующей последовательности, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, второй из двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, C-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 30 аминокислот до 1600 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, C-концевая часть белка отоферлина имеет длину от 200 аминокислот до 1500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, второй вектор дополнительно включает сигнальную последовательность poly(dA). В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, кодирующая последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина, содержит экзоны 22-48 изоформы 5 гена отоферлина человека. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, второй вектор дополнительно включает последовательности для стабилизации мРНК. Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, дополнительно включают фармацевтически приемлемый эксципиент.

Также в настоящем документе предложены наборы, которые включают любую из описанных в настоящем документе композиций. Некоторые варианты осуществления любого из наборов, описанных в настоящем документе, дополнительно включают предварительно заполненный шприц, содержащий композицию.

Также в настоящем документе предложены способы, включающие введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, млекопитающим является человек. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, млекопитающее ранее было идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлиан.

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

В настоящем документе также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина, например полноразмерного белка отоферлина, во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, которые включают: введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у млекопитающего ранее было идентифицировано наличие дефектного гена отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, млекопитающим является человек.

В настоящем документе также предложены способы лечения внесиндромной нейросенсорной потери слуха у субъекта, у которого выявлен дефектный ген отоферлина, которые включают введение терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе, в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе субъектом является человек. Некоторые варианты осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, дополнительно включают, перед стадией введения, определение наличия у субъекта дефектного гена отоферлина.

В настоящем документе также предложены композиции, которые включают два разных вектора нуклеиновой кислоты, где: первый вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновой кислоты включает промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3' конце промотора, и сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3' конце первой кодирующей последовательности; и второй вектор нуклеиновой кислоты из двух разных векторов нуклеиновой кислоты включает сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3' конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования на 3’ конце второй кодирующей последовательности; где каждая из кодируемых частей имеет длину, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков, где аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются, где ни один вектор из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего с образованием транскриптов РНК, происходит сплайсинг между сигнальной последовательностью донора сплайсинга на одном транскрипте и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга на другом транскрипте, в результате чего образуется рекомбинантная молекула РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, кодирующая последовательность, по меньшей мере, одного из векторов включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами.

В настоящем документе также предложены композиции, которые включают: первый вектор нуклеиновой кислоты, включающий промотор, первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце промотора, сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце первой кодирующей последовательности и первого обнаруживаемого маркерного гена, расположенного на 3’ конце сигнальной последовательности донора сплайсинга; и второй вектор нуклеиновой кислоты, отличный от первого вектора нуклеиновой кислоты, включающий второй обнаруживаемый маркерный ген, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3’ конце второго обнаруживаемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3’ конце второй кодирующей последовательности; где каждая из кодируемых частей имеет длину, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков, где соответствующие аминокислотные последовательности кодируемых частей не перекрываются друг с другом, где ни один вектор из двух разных векторов не кодирует полноразмерный белок отоферлин, и, когда кодирующие последовательности транскрибируются в клетке млекопитающего с образованием РНК-транскриптов, происходит сплайсинг между сигналом донора сплайсинга на одном транскрипте и сигналом акцептора сплайсинга на другом транскрипте, в результате чего образуется рекомбинантная молекула РНК, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, кодирующая последовательность по меньшей мере, одного из векторов включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый или второй обнаруживаемый маркерный ген кодирует щелочную фосфатазу. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый и второй обнаруживаемые маркерные гены являются одинаковыми.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, кодирующая последовательность, по меньшей мере, одного из векторов включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами.

Также в настоящем документе предложены наборы, которые включают любую из композиций, описанных в настоящем документе. Некоторые варианты осуществления любого из наборов, описанных в настоящем документе, дополнительно включают предварительно заполненный шприц, содержащий композицию.

Также в настоящем документе предложены способы, включающие введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, млекопитающим является человек. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у млекопитающего ранее было идентифицировано наличие дефектного гена отоферлина.

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

Также в настоящем документе предложены способы увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, которые включают введение в улитку терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у млекопитающего ранее было идентифицировано наличие дефектного гена отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, млекопитающим является человек.

В настоящем документе также предложены способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, у которого выявлен дефектный ген отоферлина, которые включают введение терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе, в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, субъектом является человек. Некоторые варианты осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, дополнительно включают, перед стадией введения, определение наличия у субъекта дефектного гена отоферлина.

В настоящем документе предложены терапевтические композиции, включающие множество векторов аденоассоциированного вируса (AAV), где множество векторов AAV способны образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, множество векторов AAV способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

Некоторые варианты осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, дополнительно включают первый вектор AAV и второй вектор AAV, где первый и второй векторы AAV независимо имеют упаковочную способность менее примерно 6 т.н.

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

Некоторые варианты осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут дополнительно включать нуклеиновую кислоту (например, вектор), включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую матричную РНК слухового полипептида, кодирующую слуховой полипептид, выбранный из группы, состоящей из $Ca_v1.3$, каркасного белка, выбранного из фагота, пикколо, рибай и гармонина, Vglut3, синаптотагмина, белка прикрепления/докинга везикул, белка примирования везикул, белков слияния везикул, GluA2/3 и GluA4.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, первый вектор AAV дополнительно включает, по меньшей мере, одну промоторную последовательность, выбранную из промоторов, специфичных для улитки.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать полимерную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать мини-кольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать синтетический раствор перилимфы. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать раствор синтетической перилимфы, включающий 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ $CaCl_2$; 1-10 мМ глюкозы; и 2-50 мМ HEPES; и имеющий pH от примерно 6 до примерно 9.

Также в настоящем документе предложены терапевтические композиции, которые включают матричную РНК слухового полипептида.

Также в настоящем документе предложены терапевтические композиции, которые включают один или несколько аденовирусных (AV) векторов, где один или несколько AB-векторов способны образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, один или несколько AV-векторов способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В настоящем документе также предложены терапевтические композиции, включающие один или несколько лентивирусных векторов, где один или несколько лентивирусных векторов способны образовывать слуховую полипептидную матричную РНК в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, один или множество лентивирусных векторов способны образовывать активную, например, полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В настоящем документе также предложены хирургические способы, которые включают стадии: i) проведения в улитке человека первого разреза в первой точке разреза; ii) внутрикохлеарное введение эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, терапевтическую композицию вводят субъекту в первую точку разреза. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, терапевтическую композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, терапевтическую композицию вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, терапевтическую композицию вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее.

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

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, медицинское устройство включает множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, медицинское устройство включает множество микроигл, включающих в основном круглый первый аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, примерно 10 микрон.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, медицинское устройство включает основание и/или резервуар, способный удерживать терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, медицинское устройство включает множество полых микроигл, каждая из которых включает полость, способную переносить терапевтическую композицию.

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

Также в настоящем документе предложены терапевтические системы доставки, которые включают i) медицинское устройство, способное создавать множество разрезов в мембране круглого окна внутреннего уха человека, нуждающегося в этом, и ii) эффективную дозу терапевтической композиции, включающую множество векторов аденоассоциированного вируса (AAV), где множество векторов AAV способны образовывать активную, например, полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени внутреннего уха.

В настоящем документе также предложены средства для выполнения хирургического способа, который включает стадии: i) внутрикохлеарного введения субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе), где терапевтическую композицию можно вводить с помощью медицинского устройства, включающего a) средство для создания множества надрезов в мембране круглого окна и b) эффективную дозу терапевтической композиции.

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

В настоящем документе также предложены терапевтические композиции, которые включают один вектор аденоассоциированного вируса (AAV), где вектор AAV способен образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, единственный вектор AAV способен образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, один вектор (например, любой из векторов, описанных в настоящем документе), который включает последовательность, кодирующую активный белок отоферлин (например, любой из полноразмерных или укороченных активных белков отоферлина, описанных в настоящем документе), можно вводить субъекту.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция дополнительно включает второй вектор, отличный от вектора AAV, где один вектор AAV и второй вектор независимо имеют упаковочную способность менее примерно 6 т.н.

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, укороченный мутант отоферлина включает, по меньшей мере, один домен C2 из следующих:

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

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, укороченный мутант отоферлина не включает C-концевую область эндогенного полипептида отоферлина.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, матричная РНК слухового полипептида кодирует слуховой полипептид, выбранный из группы, состоящей из $Ca_v1.3$, каркасного белка, выбранного из фагота, пикколо, рибай и гармонина, Vglut3, синаптотагмина, белка прикрепления/докинга везикул, белка затравки везикул, белков слияния везикул, GluA2/3 и GluA4.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, отдельный вектор AAV дополнительно включает, по меньшей мере, одну промоторную последовательность, выбранную из промотора CBA, CMV или CB7.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, отдельный вектор AAV дополнительно включает, по меньшей мере, одну промоторную последовательность, выбранную из промоторов, специфичных для улитки.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать липидную наночастицу.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать полимерную наночастицу.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать мини-кольцевую ДНК.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать ДНК CELiD.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать синтетический раствор перилимфы.

В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, терапевтическая композиция составлена так, чтобы включать раствор синтетической перилимфы, включающий 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ $CaCl_2$; 1-10 мМ глюкозы; 2-50 мМ HEPES; имеющий pH от примерно 6 до примерно 9.

В настоящем документе также предложены терапевтические композиции, которые включают матричную РНК слухового полипептида, кодирующую укороченный мутант отоферлина.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится описание.

Термины «a» и «an» относятся к одному или более чем одному (т. е. по меньшей мере, одному) грамматическому объекту артикля. Например, «элемент» включает в себя один элемент и более одного элемента.

Термин «примерно» применительно к измеримому значению, такому как количество, временная продолжительность и т.п., предназначен для охвата отклонений до ±20%. Эти отклонения могут составлять, например, до ±10%, или в некоторых случаях, ±5%, или в некоторых случаях, ±1%, или в некоторых случаях, ±0,1% от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для проведения описанных способов.

Термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности посредством определенных сигнальных путей, генерируя вторичные мессенджеры или функционируя в качестве эффекторов, реагируя на такие мессенджеры. Считается, что отоферлин является сенсором кальция, необходимым для экзоцитоза во внутренних волосковых клетках, а также для высвобождения нейротрансмиттера в незрелых наружных волосковых клетках. Пять из шести доменов C2 белка отоферлина (C2B-F) связывают ионы кальция с умеренными и низкими константами аффинности в растворе (Kd=25-95 мкМ и 400-700 мкМ, соответственно) (Padmanarayana et al. 2014 Biochem 53: 5023-5033). В присутствии фосфатидилсерина (PS), концентрации кальция 10 мкМ приводят к значительному взаимодействию C2-липосомы для доменов C2C-C2E отоферлина. Таким образом, отоферлин обладает доменами, которые, по-видимому, работают с использованием механизма «электростатического переключения», а также доменами, которые связываются независимо от кальция. Было показано, что PI(4,5)P2, основная сигнальная молекула в пресинапсе, взаимодействует с доменами C2C и C2F отоферлина кальций-независимым образом (Padmanarayana et al. 2014 Biochem 53:5023-5033).

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к белковой или полипептидной последовательности, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, многоцепочечными или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами, и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут быть тетрамерами молекул иммуноглобулинов. Термин «фрагмент антитела» относится, по меньшей мере, к одной части интактного антитела или его рекомбинантным вариантам, и относится к антигенсвязывающему домену, например, антигенной определяющей вариабельной области интактного антитела, которая достаточна для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv, фрагменты антител scFv, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (либо VL, либо VH), VHH домены верблюдовых и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Термин «scFv» относится к слитому белку, включающему, по меньшей мере, один фрагмент антитела, включающий вариабельную область легкой цепи, и, по меньшей мере, один фрагмент антитела, включающий вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельные области легкой и тяжелой цепей соединены непрерывно через короткий гибкий полипептидный линкер, и способный экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, используемый в настоящем документе scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, по отношению к N-концу и C-концу полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Термин «рекомбинантный полипептид» относится к полипептиду, полученному с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, полипептид, экспрессируемый системой экспрессии вирусного вектора. Термин также следует толковать как обозначающий полипептид, который был получен в результате синтеза молекулы ДНК, кодирующей полипептид, и эта молекула ДНК экспрессирует белок или аминокислотную последовательность, определяющую полипептид, где ДНК или аминокислотная последовательность была получена с использованием технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

Термин «мутация в гене отоферлина» относится к модификации гена отоферлина дикого типа, которая приводит к продуцированию белка отоферлина, имеющего одно или несколько из следующих: делецию одной или нескольких аминокислот, одну или несколько аминокислотных замен и одну или несколько аминокислотных вставок по сравнению с белком отоферлина дикого типа, и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка отоферлина в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка отоферлина в клетке млекопитающего не имеющей мутации. В некоторых вариантах осуществления, мутация может приводить к продуцированию белка отоферлина с делецией одной или нескольких аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления, мутация может привести к сдвигу рамки в гене отоферлина. Известно, что термин «сдвиг рамки» охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, сдвиг рамки может привести к нефункциональному белку. В некоторых вариантах осуществления, точковая мутация может представлять собой нонсенс-мутацию (т.е. приводить к преждевременному появлению стоп-кодона в экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к образованию усеченного белка (по сравнению с соответствующим белком дикого типа), который может быть или не быть функциональным. В некоторых вариантах осуществления, мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК отоферлина или белка отоферлина или и мРНК, и белка. В некоторых вариантах осуществления, мутация может приводить к продуцированию измененного белка отоферлина, имеющего потерю или снижение одной или нескольких биологических активностей (функций) по сравнению с белком отоферлина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, мутация представляет собой вставку одного или нескольких нуклеотидов в ген отоферлина. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной последовательности гена отоферлина, т.е. в части гена, которая не кодирует последовательность. В некоторых вариантах осуществления, мутация в регуляторной последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена отоферлина.

Модификации могут быть введены в нуклеотидную последовательность стандартными способами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез.

Термин «модификации консервативной последовательности» относится к модификациям аминокислот, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин и изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин).

Термин «кодирование» относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матрицы для синтеза определенной последовательности аминокислот в соответствии с генетическим кодом. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если белок продуцируется транскрипцией и трансляцией мРНК, соответствующей этому гену, кДНК или РНК. И кодирующую цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно приводится в перечнях последовательностей, и некодирующую цепь, используемую в качестве матрицы для транскрипции, можно назвать кодирующим белок продуктом.

Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединиц между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя молекулами полипептида. Когда положение субъединицы в обеих двух молекулах занято одной и той же мономерной субъединицей; например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они гомологичны или идентичны в этом положении. Гомология между двумя последовательностями является прямой функцией количества совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях гомологичны, то эти две последовательности гомологичны на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или гомологичны, две последовательности гомологичны на 90%.

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

Термин «эндогенный» относится к любому материалу, происходящему из или образующемуся внутри организма, клетки, ткани или системы.

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

Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом организме, не являются «выделенными», но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в не нативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

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

Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяин. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

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

Используемый в настоящем документе термин «временная» относится к экспрессии не интегрированного трансгена в течение нескольких часов, дней или недель, где период времени экспрессии меньше, чем период времени экспрессии гена, если он интегрирован в геном или содержится в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

Предполагается, что термин «субъект» включает живые организмы, у которых можно вызвать иммунный ответ (например, млекопитающего, человека). В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой грызуна (например, крысу или мышь), кролика, овцу, собаку, кошку, лошадь, примата, отличного от человека, или человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подвержен риску развития внесиндромной глухоты. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта ранее была идентифицирована мутация в гене отоферлина. В некоторых вариантах осуществления, субъект был идентифицирован как имеющий мутацию в гене отоферлина, и у него была диагностирована бессимптомная нейросенсорная потеря слуха. В некоторых вариантах осуществления, субъект был идентифицирован, как имеющий бессимптомную нейросенсорную потерю слуха.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается уменьшением, подавлением, ремиссией или ликвидацией болезненного состояния.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» означает предотвращение или защитное лечение заболевания или болезненного состояния. «Профилактика» в этом контексте включает снижение вероятности того, что субъект заболеет.

Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения определенного биологического результата. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество композиции может приводить к повышению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа или варианта белка отоферлина, обладающего желаемой активностью) (например, по сравнению с уровнем экспрессии до лечения композицией). В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество композиции может приводить к увеличению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, белка отоферлина дикого типа, полноразмерного белка или активного варианта) в клетке-мишени (например, во внутренней волосковой клетке улитки). В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество композиции может приводить к различной клеточной локализации активного белка отоферлина (например, белка отоферлина дикого типа, полноразмерного белка или активного варианта) в клетке-мишени (например, внутренней волосковой клетке улитки). В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество композиции может приводить к повышению уровня экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа или активного варианта) и/или увеличению одного или нескольких активностей белка отоферлина в клетке-мишени (например, по сравнению с эталонным уровнем, таким как уровень(и) у субъекта до лечения, уровень(и) у субъекта, имеющего мутацию в гене отоферлина, или уровень(и) у субъекта или популяции субъектов с бессимптомной нейросенсорной потерей слуха).

Термин «парентеральное» введение композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или интрастернальную инъекцию или инфузию.

Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Если специально не ограничено, этот термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же связывающими свойствами, что и эталонная нуклеиновая кислота, и метаболизируются способом, сходным с встречающимися в природе нуклеотидами. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также безусловно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замена вырожденных кодонов может быть достигнута путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985) и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

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

В контексте настоящего описания используются следующие сокращения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. «A» относится к аденозину, «C» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «T» относится к тимидину, и «U» относится к уридину.

Используемый в настоящем документе термин «транскрибируемая in vitro РНК» относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована in vitro. Как правило, транскрибируемую in vitro РНК получают из вектора транскрипции in vitro. Вектор транскрипции in vitro включает матрицу, которую используют для создания РНК, транскрибируемой in vitro.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать, по меньшей мере, две аминокислоты, и не накладывается никаких ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут составлять последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, включающий две или несколько аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Используемый в настоящем документе термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также обычно называют пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называют белками, у которых есть множество типов. «Полипептиды» включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочего. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

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

Термин «активный белок отоферлин» означает белок, кодируемый ДНК, который, при замещении обоих аллелей дикого типа, кодирующих полноразмерный белок отоферлин в слуховых волосковых клетках (например, внутренних слуховых волосковых клетках) млекопитающего дикого типа, и при экспрессии в слуховых волосковых клетках этого млекопитающего, приводит к тому, что уровень слуха этого млекопитающего приближается к нормальному уровню слуха аналогичного млекопитающего полностью дикого типа. Неограничивающими примерами активных белков отоферлина являются полноразмерные белки отоферлина (например, любой из полноразмерных белков отоферлина, описанных в настоящем документе).

Например, активный белок отоферлин может включать последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа человека), включающую от 1 аминокислотной замены до примерно 240 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 235 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 230 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 225 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 220 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 215 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 210 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 205 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 200 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 195 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 190 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 185 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 180 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 175 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 170 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 165 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 160 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 155 аминокислот, от 1 аминокислотной замены до примерно 150 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 145 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 140 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 135 аминокислот замены, от 1 аминокислотной замены до примерно 130 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 125 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 120 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 115 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 110 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 105 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 100 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 95 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 90 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 85 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 80 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 75 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 70 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 65 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 60 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 55 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 50 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 45 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 40 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 35 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 30 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 25 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 20 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 15 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 10 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 9 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 8 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 7 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 6 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 5 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 4 аминокислотных замен, от 1 аминокислотной замены до примерно 3 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 2

аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 2

аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 8 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 7 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 6 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 5 аминокислотных замен, от примерно 2 аминокислотных замен до примерно 4 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 3

аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 8 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 7 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 6 аминокислотных замен, от примерно 3 аминокислотных замен до примерно 5 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 4

аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 8 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 7 аминокислотных замен, от примерно 4 аминокислотных замен до примерно 6 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 5

аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 5

аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 8 аминокислотных замен, от примерно 5 аминокислотных замен до примерно 7 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 6

аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 6 аминокислотных замен до примерно 8 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 7

аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 7 аминокислотных замен до примерно 9 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 8

аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 8 аминокислотных замен до примерно 10 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 10

аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 15 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 15

аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 15 аминокислотных замен до примерно 20 аминокислотных замен, от примерно 20

аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 20

аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 20 аминокислотных замен до примерно 25 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 25

аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 25 аминокислотных замен до примерно 30 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 30

аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 30 аминокислотных замен до примерно 35 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 35

аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 35 аминокислотных замен до примерно 40 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 40

аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 40 аминокислотных замен до примерно 45 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 45

аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 45 аминокислотных замен до примерно 50 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 50

аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 60 аминокислотных замен, от примерно 50 аминокислотных замен до примерно 55 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 60

аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 70 аминокислотных замен, от примерно 60 аминокислотных замен до примерно 65 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 10 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 80 аминокислотных замен, от примерно 70 аминокислотных замен до примерно 75 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 80

аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 90 аминокислотных замен, от примерно 80 аминокислотных замен до примерно 85 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 90

аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 100 аминокислотных замен, от примерно 90 аминокислотных замен до примерно 95 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 100

аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 110 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 105 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 120 аминокислотных замен, от примерно 110 аминокислотных замен до примерно 115 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 120

аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 100 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 130 аминокислотных замен, от примерно 120 аминокислотных замен до примерно 125 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 140 аминокислотных замен, от примерно 130 аминокислотных замен до примерно 135 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 140

аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 150 аминокислотных замен, от примерно 140 аминокислотных замен до примерно 145 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 160 аминокислотных замен, or от примерно 150 аминокислотных замен до примерно 155 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 160

аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 170 аминокислотных замен, от примерно 160 аминокислотных замен до примерно 165 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 180 аминокислотных замен, от примерно 170 аминокислотных замен до примерно 175 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 190 аминокислотных замен, от примерно 180 аминокислотных замен до примерно 185 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 190

аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 200 аминокислотных замен, от примерно 190 аминокислотных замен до примерно 195 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 200 аминокислотных замен до примерно 205 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 205 аминокислотных замен до примерно 210 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 210 аминокислотных замен до примерно 215 аминокислотных замен, от примерно 215 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 215 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 215 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 215 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 215 аминокислотных замен до примерно 220 аминокислотных замен, от примерно 220 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 220 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 220 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 220 аминокислотных замен до примерно 225 аминокислотных замен, от примерно 225 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 225

аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен, от примерно 225 аминокислотных замен до примерно 230 аминокислотных замен, от примерно 230 аминокислотных замен до примерно 240 аминокислотных замен, от примерно 230 аминокислотных замен до примерно 235 аминокислотных замен. Специалисту в данной области будет понятно, что аминокислоты, которые не являются консервативными между белками отоферлина дикого типа из разных видов, могут быть мутированы без потери активности, в то время как те аминокислоты, которые являются консервативными между белками отоферлина дикого типа из разных видов, не должны подвергаться мутации, поскольку они более вероятно (чем аминокислоты, которые не являются консервативными у разных видов) участвовать в активности.

Активный белок отоферлин может включать, например, последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа (например, полноразмерного белка отоферлина дикого типа человека), в котором от 1 аминокислоты до примерно 200 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 195 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 190 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 185 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 180 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 175 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 170 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 165 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 160 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 155 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 150 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 145 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 140 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 135 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 130 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 125 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 120 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 115 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 110 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 105 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 100 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 95 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 90 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 85 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 80 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 75 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 70 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 65 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 60 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 55 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 50 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 45 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 40 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 35 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 30 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 25 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 20 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 15 аминокислот, 1 от одной аминокислоты до примерно 10 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 9 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 8 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 7 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 6 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 5 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 4 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 3

аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 5 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 4 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 130

аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 5 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 50

аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 175

аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 80

аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 200

аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 75

аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 45 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 100

аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 55 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 105

аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 65 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 90

аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 75 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 85 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 95 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 105 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 105 аминокислот до примерно 110 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 110 аминокислот до примерно 115 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 115 аминокислот до примерно 120 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 120 аминокислот до примерно 125 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 125 аминокислот до примерно 130 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 130 аминокислот до примерно 135 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 135 аминокислот до примерно 140 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 140 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 145 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 145 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 155 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 155 аминокислот до примерно 160 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 160 аминокислот до примерно 165 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 165 аминокислот до примерно 170 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 170 аминокислот до примерно 175 аминокислот, от примерно 175 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 175 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 175 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 175 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 175 аминокислот до примерно 180 аминокислот, от примерно 180 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 180 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 180 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 180 аминокислот до примерно 185 аминокислот, от примерно 185 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 185 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 185 аминокислот до примерно 190 аминокислот, от примерно 190 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 190 аминокислот до примерно 195 аминокислот, от примерно 195 аминокислот до примерно 200 аминокислот, удалены. В некоторых вариантах осуществления, где две или несколько аминокислот удалены из последовательности полноразмерного белка отоферлина дикого типа, две или более удаленные аминокислоты могут быть смежными в последовательности полноразмерного белка дикого типа. В других примерах, где две или несколько аминокислот удалены из последовательности полноразмерного белка отоферлина дикого типа, две или несколько удаленных аминокислот не являются смежными в последовательности полноразмерного белка дикого типа. Специалисты должны понимать, что аминокислоты, не являющиеся консервативными между полноразмерными белками отоферлина дикого типа из разных видов, могут быть удалены без потери активности, в то время как те аминокислоты, которые консервативны между полноразмерными белками отоферлина дикого типа из разных видов, не должны быть удалены,. поскольку они с большей вероятностью (чем аминокислоты, которые не являются консервативными у разных видов) участвуют в активности.

В некоторых примерах активный белок отоферлин может, например, включать последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа, в котором от 1 аминокислоты до примерно 100 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 95 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 90 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 85 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 80 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 75 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 70 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 65 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 60 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 55 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 50 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 45 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 40 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 35 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 30 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 25 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 20 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 15 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 10 аминокислот, от 1 аминокислоты кислоты до примерно 9 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 8 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 7 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 6 аминокислот кислот, от 1 аминокислоты до примерно 5 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 4 аминокислот, от 1 аминокислоты до примерно 3 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 7

аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 5 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до примерно 4 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до примерно 5 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до примерно 6 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 55

аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до примерно 7 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до примерно 8 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до примерно 9 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 70

аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до примерно 10 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 20 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до примерно 15 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 35 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 30 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до примерно 25 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 40 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 35

аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до примерно 45 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 60 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 55 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 70 аминокислот, от примерно 60 аминокислот до примерно 65 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 80 аминокислот, от примерно 70 аминокислот до примерно 75 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 95 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 90 аминокислот, от примерно 80 аминокислот до примерно 85 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 90 аминокислот до примерно 95 аминокислот или от примерно 95 аминокислот до примерно 100 аминокислот, удалены из его N-конца и/или из его C-конца.

В некоторых вариантах осуществления активный белок отоферлин может, например, включать последовательность полноразмерного белка отоферлина дикого типа, в который от 1 аминокислоты до 50 аминокислот, от 1 аминокислоты до 45 аминокислот, от 1 аминокислоты до 40 аминокислот, от 1 аминокислоты до 35 аминокислот, от 1 аминокислоты до 30 аминокислот, от 1 аминокислоты до 25 аминокислот, от 1 аминокислоты до 20 аминокислот, от 1 аминокислоты до 15 аминокислот, от 1 аминокислоты до 10 аминокислот, от 1 аминокислоты до 9 аминокислот, от 1 аминокислоты до 8 аминокислот, от 1 аминокислоты до 7 аминокислот, от 1 аминокислоты до 6 аминокислот, от 1 аминокислоты до 5 аминокислот, от 1 аминокислоты до 4 аминокислот, от 1 аминокислоты до 3 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 8 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 7 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 6 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 5 аминокислот, от примерно 2 аминокислот до 4 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 8 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 7 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 6 аминокислот, от примерно 3 аминокислот до 5 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 8 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 7 аминокислот, от примерно 4 аминокислот до 6 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 8 аминокислот, от примерно 5 аминокислот до 7 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 6 аминокислот до 8 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 7 аминокислот до 9 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 8 аминокислот до 10 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 10 аминокислот до 15 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 15 аминокислот до 20 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 20 аминокислот до 25 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 25 аминокислот до 30 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до 35 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до 45 аминокислот, от примерно 35 аминокислот до 40 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до 50 аминокислот, от примерно 40 аминокислот до 45 аминокислот, or от примерно 45 аминокислот до примерно 50 аминокислот вставлены. В некоторых примерах вставленная(ые) аминокислота(ы) может(гут) быть вставлена(ы) как непрерывная последовательность в последовательность полноразмерного белка дикого типа. В некоторых примерах, аминокислота(ы) не вставлена(ы) в виде непрерывной последовательности в последовательность полноразмерного белка дикого типа. Как можно понять в данной области техники, аминокислота(ы) может(гут) быть вставлена(ы) в часть последовательности полноразмерного белка дикого типа, которая не является хорошо консервативной между видами.

Диапазоны: в этом описании, различные аспекты описания могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема описания. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как имеющее конкретно описанные поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, такой диапазон, как 95-99% идентичность, включает в себя примерно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, включая поддиапазоны, такие как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичность. Это применимо независимо от широты диапазона.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 96. В одном аспекте настоящего изобретения, предложен рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 105.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает рекомбинантный вектор AAV, который содержит, в порядке от 5' до 3': 5' ITR последовательность SEQ ID NO: 97; промотор CAG, содержащий элемент раннего энхансера CMV SEQ ID NO: 98, последовательность гена бета-актина цыпленка SEQ ID NO: 99 и химерный интрон SEQ ID NO: 100; кодирующую область 5'OTOF, которая содержит экзоны с 1 по (и до) 21 кДНК OTOF; последовательность интрона SD SEQ ID NO: 102; рекомбиногенную AK последовательность SEQ ID NO: 103; и 3’ ITR последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 5'OTOF представляет собой SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 5'OTOF на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 101, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 101.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает рекомбинантный вектор AAV, который содержит, по порядку от 5' до 3': 5' ITR последовательность SEQ ID NO: 97; рекомбиногенную AK последовательность SEQ ID NO: 103; последовательность интрона SA SEQ ID NO: 106; кодирующую область 3’ OTOF, которая содержит экзоны с 22 по (и до) экзон 48 кДНК OTOF; polyA bgH последовательность SEQ ID NO: 108; и 3’ ITR последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 3'OTOF представляет собой SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 3'OTOF на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 107, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 107.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает частицу rAAV, содержащую один из вышеупомянутых рекомбинантных векторов AAV, инкапсулированный капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает композицию, содержащую первую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 96, и вторую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вектор AAV первой частицы rAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вектор AAV второй частицы rAAV инкапсулирован капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, каждый из рекомбинантных векторов AAV первой и второй частиц rAAV независимо инкапсулирован капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает композицию, содержащую (a) первую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV, который содержит, по порядку от 5' до 3': 5' ITR последовательность SEQ ID NO: 97; промотор CAG, содержащий элемент раннего энхансера CMV SEQ ID NO: 98, последовательность гена бета-актина цыпленка SEQ ID NO: 99 и химерный интрон SEQ ID NO: 100; кодирующую область 5'OTOF, которая содержит экзоны с 1 по (и до) 21 кДНК OTOF; последовательность интрона SD SEQ ID NO: 102; рекомбиногенная AK последовательность SEQ ID NO: 103; и 3’ ITR последовательность SEQ ID NO: 104; и (b) вторую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV, который содержит 5' ITR последовательность SEQ ID NO: 97; рекомбиногенную AK последовательность SEQ ID NO: 103; последовательность интрона SA SEQ ID NO: 106; 3’ кодирующая область OTOF, которая содержит экзоны с 22 по (и через) экзон 48 кДНК OTOF; последовательность polyA bgH SEQ ID NO: 108; и 3’ ITR последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 5'OTOF представляет собой SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 5'OTOF, по меньшей мере, на 70% идентична SEQ ID NO: 101, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 3'OTOF представляет собой SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая область 3'OTOF на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или на 100% идентична SEQ ID NO: 107 и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и кодируемая SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы AAV в каждой из первой и второй частиц rAAV независимо инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO:

109.

В одном аспекте, когда вышеуказанную композицию вводят в клетку человека, рекомбинантные векторы AAV первой и второй частиц rAAV подвергаются конкатамеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полноразмерный белок отоферлин внутри клетки.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ, включающий введение в улитку млекопитающего (например, человека) терапевтически эффективного количества любой из вышеупомянутых композиций. В некоторых вариантах осуществления, у млекопитающего ранее было идентифицировано наличие дефектного гена отоферлина.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, включающий введение любой из вышеупомянутых композиций в клетку млекопитающего, например, во внутреннюю волосковую клетку, например, клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, ранее было определено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, например человека, где способ включает введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из вышеупомянутых композиций. В некоторых вариантах осуществления, у млекопитающего ранее было идентифицировано наличие дефектного гена отоферлина.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, например человека, у которого выявлен дефектный ген отоферлина, где способ включает введение терапевтически эффективного количества любой из вышеупомянутых композиций в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает, до стадии введения, определение наличия у субъекта дефектного гена отоферлина. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят в улитку с помощью микрокатетера. В некоторых вариантах осуществления, микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM. В некоторых вариантах осуществления, дистальный конец микрокатетера состоит из, по меньшей мере, одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

В одном аспекте, настоящее описание предлагает набор, содержащий любую из вышеупомянутых композиций. В некоторых вариантах осуществления, композиция предварительно загружена в устройство, например микрокатетер. В некоторых вариантах осуществления, микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM. В некоторых вариантах осуществления, дистальный конец микрокатетера состоит из, по меньшей мере, одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное описание. Способы и материалы описаны в настоящем документе для использования в настоящем описании; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

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

Было обнаружено, что заявляемые в настоящем документе способы приводят к экспрессии полноразмерного отоферлина во внутренних слуховых волосковых клетках и к успешному восстановлению слуха с порогами ABR от 30 дБ до 70 дБ для щелчковых стимулов и от 50 дБ до 90 дБ для чистых тонов у мышей с нокаутом отоферлина. Ввиду этого открытия, в настоящем документе предложены композиции и способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта (например, человека), у которого выявлен дефектный ген отоферлина.

В настоящем документе предложены композиции, которые включают, по меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот, где: каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов включает кодирующую последовательность, кодирующую разные части белка отоферлина, где каждая из кодируемых частей содержит, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков в длину, где аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей; ни один из, по меньшей мере, двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин); по меньшей мере, одна из кодирующих последовательностей содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность между двумя соседними экзонами; и при введении в клетку млекопитающего, по меньшей мере, два разных вектора подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, где рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). В некоторых примерах, рекомбинированная нуклеиновая кислота, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин), существует в виде эписомы в клетке млекопитающего (например, в любом из типов клеток млекопитающих, описанных в настоящем документе). Также предложены наборы, которые включают любую из описанных в настоящем документе композиций. Также, в настоящем документе предложены способы, включающие введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

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

Дополнительные неограничивающие аспекты композиций, наборов и способов описаны в настоящем документе и могут быть использованы в любой комбинации без ограничений.

Отоферлин

Ген OTOF человека кодирует отоферлин, который представляет собой белок, который в некоторых вариантах осуществления играет критическую роль в примировании, слиянии и/или пополнении синаптических везикул синапсов внутренних волосковых клеток во время кодирования звука. На сегодняшний день идентифицировано несколько сотен мутаций в гене OTOF человека, вызывающих глубокую доречевую глухоту DFNB9. Такие мутации являются причиной глухоты у 2-8% людей, которые рождаются с аутосомно-рецессивно наследуемой, внесиндромной глухотой в разных популяциях (Rodríguez-Ballesteros et al. (2008) Hum. Mutat. 29 823-831; Choi et al. (2009) Clinical Genetics 75 237-243; Duman et al. (2011) Genet Test Mol Biomarkers 15 29-33; Varga et al. (2006) J Med Genet 43 576-581; Iwasa et al. (2013) BMC Med. Genet. 14 95). Мутации биаллельного гена отоферлина вызывают локальные дефекты синаптической передачи между волосковыми клетками и слуховым нервом. Отоферлин позволяет сенсорным клеткам высвобождать нейротрансмиттеры в ответ на стимуляцию звуком, чтобы активировать слуховые нейроны, и эти нейроны передают закодированную электронным способом акустическую информацию в мозг для воспроизведения «слуха». При наличии биаллельных мутаций в OTOF, эта передача нарушается, и в результате у большинства субъектов возникает врожденная нейросенсорная потеря слуха от тяжелой до глубокой.

Например, две замены в экзоне 15 в положениях 490 и 515 в консервативном домене C2C отоферлина вызывают DFNB9 (Mirqhomizadeh et al. (2002) Neurobiol. Dis. 10(2): 157-164). Migliosi et al. обнаружили новую мутацию Q829X в OTOF у испанских субъектов с доречевой внесиндромной потерей слуха (Migliosi et al. (2002) J. Med. Genet. 39(7): 502-506).

Дополнительные типовые мутации в гене отоферлина, обнаруженные у субъектов с потерей слуха, и способы секвенирования нуклеиновой кислоты, кодирующей отоферлин, описаны, например, в Rodriguez-Ballesteros et al. (2003) Hum Mutat. 22: 451-456; Wang et al. (2010) BMC Med Genet. 11:79; Yildirim-Baylan et al. (2014) Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol 78: 950-953; Choi et al. (2009) Clin. Genet. 75(3): 237-243; и Marlin et al. (2010) Biochem Biophys Res Commun 394: 737-742.

Отоакустическая эмиссия у субъектов с DFNB9 является нормальной, по меньшей мере, в течение первого десятилетия жизни, что указывает на морфологическую целостность внутреннего уха и правильное функционирование наружных волосковых клеток. Помимо отсутствия синаптической передачи и последующей потери синапсов, морфология и физиология внутреннего уха остаются сохранными у DFNB9, по меньшей мере, в течение первого десятилетия жизни человека. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, восстановление функции OTOF и/или отоферлина может служить для смягчения или профилактики вторичной дегенерации одной или нескольких структур улитки.

Исследования на мышиных моделях показали, что синапсы являются структурно нормальными, и IHC сохраняют нормальное количество синапсов у мышей в течение первой постнатальной недели. Между P6 и P15 теряется примерно половины синапсов (Roux et al. (2006) Cell 127 277-289). Модели на животных позволили изучить влияние мутаций в отоферлине на синаптическую передачу путем регистрации изменения емкости плазматической мембраны после слияния везикул и активности в слуховом нерве. У мышей с нокаутом отоферлина (Otof-/-) почти не может быть запущен экзоцитоз в IHC посредством индуцированного деполяризацией притока Ca2+ через потенциалзависимые Ca2+ каналы (Roux et al. (2006) Cell 127 277-289). У мышей с глубоким нарушением слуха пачанга (OtofPga/Pga) со случайной точечной мутацией в домене C2F короткие (<10 мс) деполяризации IHC вызывали слияние везикул того же размера, что и у мышей дикого типа, однако длительные стимуляции выявили сильный дефицит в пополнение везикул до легко высвобождаемого пула (Pangrsic et al. (2010) Nat. Neurosci. 13 869-876). Мутация p.Ile515Thr, обнаруженная у людей со слегка повышенным порогом слуха, но выраженным снижением понимания речи и температурозависимым оглушением (Varga et al. (2006) J Med Genet 43 576-581), выявила промежуточный фенотип при исследовании на мышиной модели (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35:2519-2535). Эти мыши OtofI515T/I515T показали умеренное повышение порогов слуха при оценке ABR со снижением амплитуды волны I, но нормальные пороги слуха в поведенческих тестах и записи отдельных единиц слухового нерва. Экзоцитоз RRP снова является интактным, но устойчивый экзоцитоз снижен, хотя и не так выражен, как у OtofPga/Pga. В то время как у мышей дикого типа при комнатной температуре во время продолжительного стимула 750 везикул могут сливаться в секунду в каждой активной зоне, эта скорость снижается до 350 везикул/с/активную зону у мышей OtofI515T/I515T и до 200 везикул/с/активную зону у мышей OtofPga/Pga IHC (Pangrsic et al. (2010) Nat. Neurosci. 13 869-876; Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Это коррелирует с более низкими уровнями белка отоферлина на плазматической мембране IHC, что указывает на то, что количество отоферлина зависит от экзоцитоза и слуха (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535).

Способы обнаружения мутаций в гене хорошо известны в данной области техники. Неограничивающие примеры таких методов включают: полимеразную цепную реакцию в реальном времени (РВ-ПЦР), ПЦР, секвенирование, Саузерн-блоттинг и Нозерн-блоттинг.

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

Ген OTOF человека расположен на хромосоме 2p23.3. Он содержит 48 экзонов, охватывающих ~132 тысячи нуклеотидов (т.н.) (№ доступа NCBI NG009937.1). мРНК, кодирующая длинную форму отоферлина, экспрессируемого в головном мозге, включает 48 экзонов (Yasunaga et al., Am. J. Hum. Genet. 67:591-600, 2000). Прямые и обратные праймеры, которые можно использовать для амплификации каждого из 48 экзонов в гене OTOF, описаны в таблице 2 в Yasunaga et al., Am. J. Hum. Genet. 67:591-600, 2000. В некоторых примерах, полноразмерный белок OTOF представляет собой полноразмерный белок OTOF дикого типа. Полноразмерный белок OTOF дикого типа, экспрессируемый из гена OTOF человека, имеет длину 1997 остатков.

Типовой белок отоферлин человека дикого типа представляет собой или включает последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5. Изоформа е белка отоферлина человека (SEQ ID NO: 5) кодируется мРНК, которая включает экзон 48 и не включает экзон 47 гена отоферлина (Yasunaga et al., Am. J. Hum. Genet. 67:591-600, 2000). В некоторых вариантах осуществления, активный белок отоферлин имеет последовательность SEQ ID NO: 5, но в нем отсутствуют 20 аминокислот, включая мотив RXR, указанный в Strenzke et al., EMBO J. 35(23):2499-2615, 2016. Неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, кодирующих белок отоферлин дикого типа, представляют собой или включают любую из SEQ ID NO: 7-11. Как можно понять в данной области техники, по меньшей мере, некоторые или все кодоны в SEQ ID NO: 7-11 могут быть кодонам-оптимизированы, чтобы обеспечить оптимальную экспрессию у млекопитающего, отличного от человека, или у человека. Ортологи белков отоферлина человека известны в данной области техники.

Последовательности кДНК белка отоферлина человека:

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

Изоформа 2 человека (короткая 1) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 2) (также называемая изоформой d отоферлина) (№ доступа NCBI NP_919304.1)

Изоформа 3 человека (короткая 2) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 3) (также называемая изоформой c отоферлина) (№ доступа NCBI NP_919303.1)

Изоформа 4 человека (короткая 3) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 4) (также называемая изоформой b отоферлина) (№ доступа NCBI NP_004793.2)

Изоформа 5 человека (короткая 4) (белок отоферлин) (SEQ ID NO: 5) (также называемая изоформой e отоферлина) (№ доступа NCBI NP_001274418.1)

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

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

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

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

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

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

Неограничивающим примером последовательности геномной ДНК отоферлина дикого типа человека является SEQ ID NO: 12. Экзоны в SEQ ID NO: 12 представляют собой: положения нуклеотидов 5001-5206 (экзон 1), положения нуклеотидов 25925-25983 (экзон 2), положения нуклеотидов 35779-35867 (экзон 3), положения нуклеотидов 44590-44689 (экзон 4), положения нуклеотидов 47100-47281 (экзон 5), положения нуклеотидов 59854-59927 (экзон 6), положения нуклеотидов 61273-61399 (экзон 7), положения нуклеотидов 61891-61945 (экзон 8), положения нуклеотидов 68626-68757(экзон 9), положения нуклеотидов 73959-74021 (экзон 10), положения нуклеотидов 74404-74488 (экзон 11), положения нуклеотидов 79066-79225 (экзон 12), положения нуклеотидов 80051-80237 (экзон 13), положения нуклеотидов 81107-81293 (экзон 14), положения нуклеотидов 82690-82913 (экзон 15), положения нуклеотидов 83388-83496 (экзон 16), положения нуклеотидов 84046-84226 (экзон 17), положения нуклеотидов 84315-84435 (экзон 18), положения нуклеотидов 85950-86050 (экзон 19), положения нуклеотидов 86193-86283 (экзон 20), положения нуклеотидов 86411-86527 (экзон 21), положения нуклеотидов 86656-86808 (экзон 22), положения нуклеотидов 87382-87571 (экзон 23), положения нуклеотидов 87661-87785 (экзон 24), положения нуклеотидов 88206-88340 (экзон 25), положения нуклеотидов 89025-89186 (экзон 26), положения нуклеотидов 89589-89708 (экзон 27), положения нуклеотидов 90132-90293 (экзон 28), положения нуклеотидов 90405-90567 (экзон 29), положения нуклеотидов 91050-91180 (экзон 30), положения нуклеотидов 92549-92578 (экзон 31), положения нуклеотидов 92978-93106 (экзон 32), положения нуклеотидов 95225-95291 (экзон 33), положения нуклеотидов 96198-96334 (экзон 34), положения нуклеотидов 96466-96600 (экзон 35), положения нуклеотидов 96848-96985 (экзон 36), положения нуклеотидов 97623-97750 (экзон 37), положения нуклеотидов 97857-98027 (экзон 38), положения нуклеотидов 98670-98830 (экзон 39), положения нуклеотидов 99593-99735 (экзон 40), положения нуклеотидов 100128-100216 (экзон 41), положения нуклеотидов 101518-101616 (экзон 42), положения нуклеотидов 101762-102003 (экзон 43), положения нуклеотидов 102669-102847 (экзон 44), положения нуклеотидов 102952-103052 (экзон 45), положения нуклеотидов 103494-103691 (экзон 46), положения нуклеотидов 105479-106496 (экзон 47) и экзон 48 (последовательность начиная с CCGGCCCGAC; см. также описание этого экзона в Yasunaga et al., Am. J. Hum. Genet. 67:591-600, 2000).

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

99736-100127 (интрон 41), положениях нуклеотидов 100217-101517 (интрон 42), положениях нуклеотидов 101617-101761 (интрон 43), положениях нуклеотидов 102004-102668 (интрон 44), положениях нуклеотидов 102848-102951 (интрон 45), положениях нуклеотидов 103053-103494 (интрон 46), положениях нуклеотидов 103692-105478 (интрон 47), and положениях нуклеотидов 106497-108496 (интрон 48).

В некоторых вариантах осуществления, ген отоферлина может быть разделен на два или несколько сегментов между любыми подходящими экзонами и/или интронами или внутри них, где каждый сегмент включен в другой вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, ген отоферлина расщеплен по экзону 21, т.е. с экзонами с 1 по (и до) 21 в первом векторе и с экзонами с 22 по (и до) экзон 48 во втором векторе. В некоторых таких вариантах осуществления, сегменты отоферлина в первом и втором векторах происходят из последовательности кДНК отоферлина и не содержат интроны, т.е. с экзонами от 1 по (и до) 21 в первом векторе и экзонами от 22 по (и до) экзон 48 во втором векторе, в каждом векторе отсутствуют интроны отоферлина. В некоторых вариантах осуществления, ген отоферлина может быть расщеплен по одному или нескольким другим экзонам и/или интронам при условии, что при объединении со всеми другими компонентами вектора упаковочная способность вектора не превышается.

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

Белок отоферлина мыши (SEQ ID NO: 13) (№ доступа NCBI NP_001300696.1)

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

Последовательность гена отоферлина мыши (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83762) (SEQ ID NO: 15) Доступ: NC_000071 ОБЛАСТЬ: комплемент(30367066..30462730) GPC_000000778; эталонная последовательность NCBI: NC_000071.6

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

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

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

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

Белок отоферлин крысы (SEQ ID NO: 20)

Белок отоферлин данио (SEQ ID NO: 21)

Белок отоферлин коровы (SEQ ID NO: 22)

Белок отоферлин бабуина (SEQ ID NO: 23)

В некоторых вариантах осуществления, первый вектор содержит 5' часть кДНК OTOF, например, как показано в SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления, второй вектор содержит 3' часть кДНК OTOF, например, как показано в SEQ ID NO: 95.

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

ATGGCCCTGATTGTTCACCTCAAGACTGTCTCAGAGCTCCGAGGCAAAGGTG
ACCGGATTGCCAAAGTCACTTTCCGAGGGCAGTCTTTCTACTCCCGGGTCCTGGAGA
ACTGCGAGGGTGTGGCTGACTTTGATGAGACGTTCCGGTGGCCAGTGGCCAGCAGC
ATCGACCGGAATGAAGTGTTGGAGATTCAGATTTTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGC
AACAAGCTGATAGGGACCTTCTGCATGGTGCTGCAGAAAGTGGTGGAGGAGAATCG
GGTAGAGGTGACCGACACGCTGATGGATGACAGCAATGCTATCATCAAGACCAGCC
TGAGCATGGAGGTCCGGTATCAGGCCACAGATGGCACTGTGGGCCCCTGGGATGAT
GGAGACTTCCTGGGAGATGAATCCCTCCAGGAGGAGAAGGACAGCCAGGAGACAG
ATGGGCTGCTACCTGGTTCCCGACCCAGCACCCGGATATCTGGCGAGAAGAGCTTTC
GCAGAGCGGGAAGGAGTGTGTTCTCGGCCATGAAACTCGGCAAAACTCGGTCCCAC
AAAGAGGAGCCCCAAAGACAAGATGAGCCAGCAGTGCTGGAGATGGAGGACCTGG
ACCACCTAGCCATTCAGCTGGGGGATGGGCTGGACCCTGACTCCGTGTCTCTAGCCT
CGGTCACCGCTCTCACCAGCAATGTCTCCAACAAACGGTCTAAGCCAGATATTAAGA
TGGAGCCCAGTGCTGGAAGGCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCACAGTGATTGAG
GCTCGGCAGCTGGTGGGCTTGAACATGGACCCTGTGGTGTGTGTGGAGGTGGGTGA
TGACAAGAAATACACGTCAATGAAGGAGTCCACAAACTGCCCTTACTACAACGAGT
ACTTTGTCTTCGACTTCCATGTCTCTCCTGATGTCATGTTTGACAAGATCATCAAGAT
CTCGGTTATCCATTCTAAGAACCTGCTTCGGAGCGGCACCCTGGTGGGTTCCTTCAA
AATGGATGTGGGGACTGTGTATTCCCAGCCTGAACACCAGTTCCATCACAAATGGGC
CATCCTGTCAGACCCCGATGACATCTCTGCTGGGTTGAAGGGTTATGTAAAGTGTGA
TGTCGCTGTGGTGGGCAAGGGAGACAACATCAAGACACCCCACAAGGCCAACGAGA
CGGATGAGGACGACATTGAAGGGAACTTGCTGCTCCCCGAGGGCGTGCCCCCCGAA
CGGCAGTGGGCACGGTTCTATGTGAAAATTTACCGAGCAGAGGGACTGCCCCGGAT
GAACACAAGCCTCATGGCCAACGTGAAGAAGGCGTTCATCGGTGAGAACAAGGACC
TCGTCGACCCCTATGTGCAAGTCTTCTTTGCTGGACAAAAGGGCAAAACATCAGTGC
AGAAGAGCAGCTATGAGCCGCTATGGAATGAGCAGGTCGTCTTCACAGACTTGTTC
CCCCCACTCTGCAAACGCATGAAGGTGCAGATCCGGGACTCTGACAAGGTCAATGA
TGTGGCCATCGGCACCCACTTCATCGACCTGCGCAAGATTTCCAACGATGGAGACAA
AGGCTTCCTGCCTACCCTCGGTCCAGCCTGGGTGAACATGTACGGCTCCACGCGCAA
CTACACACTGCTGGACGAGCACCAGGACTTGAATGAAGGCCTGGGGGAGGGTGTGT
CCTTCCGGGCCCGCCTCATGTTGGGACTAGCTGTGGAGATCCTGGACACCTCCAACC
CAGAGCTCACCAGCTCCACGGAGGTGCAGGTGGAGCAGGCCACGCCTGTCTCGGAG

AGCTGCACAGGGAGAATGGAAGAATTTTTCTATTTGGAGCCTTCTTGGAAGCCTCA ATGATTGACCGGAAAAATGGGGACAAGCCAATTACCTTTGAGGTGACCATAGGAAA CTACGGCAATGAAGTCGATGGTATGTCCCGGCCCCTGAGGCCTCGGCCCCGGAAAG AGCCTGGGGATGAAGAAGAGGTAGACCTGATTCAGAACTCCAGTGACGATGAAGGT GACGAAGCCGGGGACCTGGCCTCGGTGTCCTCCACCCCACCTATGCGGCCCCAGATC ACGGACAGGAACTATTTCCACCTGCCCTACCTGGAGCGCAAGCCCTGCATCTATATC AAGAGCTGGTGGCCTGACCAGAGGCGGCGCCTCTACAATGCCAACATCATGGATCA CATTGCTGACAAGCTGGAAGAAGGCCTGAATGATGTACAGGAGATGATCAAAACGG AGAAGTCCTACCCGGAGCGCCGCCTGCGGGGTGTGCTAGAGGAACTCAGCTGTGGC TGCCACCGCTTCCTCTCCCTCTCGGACAAGGACCAGGGCCGCTCGTCCCGCACCAGG CTGGATCGAGAGCGTCTTAAGTCCTGTATGAGGGAGTTGGAGAGCATGGGACAGCA GGCCAAGAGCCTGAGGGCTCAGGTGAAGCGGCACACTGTTCGGGACAAGCTGAGGT CATGCCAGAACTTTCTGCAGAAGCTACGCTTCCTGGCGGATGAG

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

CCCCAGCACAGCATTCCGGATGTGTTCATTTGGATGATGAGCAACAACAAAC GTATCGCCTATGCCCGCGTGCCTTCCAAAGACCTGCTCTTCTCCATCGTGGAGGAGG AACTGGGCAAGGACTGCGCCAAAGTCAAGACCCTCTTCCTGAAGCTGCCAGGGAAG AGGGGCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGTACAGGCCAAGCTGGAGCTCTACCTGTG GCTGGGCCTCAGCAAGCAGCGAAAGGACTTCCTGTGTGGTCTGCCCTGTGGCTTCGA GGAGGTCAAGGCAGCCCAAGGCCTGGGCCTGCATTCCTTTCCGCCCATCAGCCTAGT CTACACCAAGAAGCAAGCCTTCCAGCTCCGAGCACACATGTATCAGGCCCGAAGCC TCTTTGCTGCTGACAGCAGTGGGCTCTCTGATCCCTTTGCCCGTGTCTTCTTCATCAA CCAGAGCCAATGCACTGAGGTTCTAAACGAGACACTGTGTCCCACCTGGGACCAGA TGCTGGTATTTGACAACCTGGAGCTGTACGGTGAAGCTCACGAGTTACGAGATGATC CCCCCATCATTGTCATTGAAATCTACGACCAGGACAGCATGGGCAAAGCCGACTTCA TGGGCCGGACCTTCGCCAAGCCCCTGGTGAAGATGGCAGATGAAGCATACTGCCCA CCTCGCTTCCCGCCGCAGCTTGAGTACTACCAGATCTACCGAGGCAGTGCCACTGCC GGAGACCTACTGGCTGCCTTCGAGCTGCTGCAGATTGGGCCATCAGGGAAGGCTGA CCTGCCACCCATCAATGGCCCAGTGGACATGGACAGAGGGCCCATCATGCCTGTGC CCGTGGGAATCCGGCCAGTGCTCAGCAAGTACCGAGTGGAGGTGCTGTTCTGGGGC CTGAGGGACCTAAAGAGGGTGAACCTGGCCCAGGTGGACCGACCACGGGTGGACAT CGAGTGTGCAGGAAAGGGGGTACAATCCTCCCTGATTCACAATTATAAGAAGAACC CCAACTTCAACACGCTGGTCAAGTGGTTTGAAGTGGACCTCCCGGAGAATGAGCTCC TGCACCCACCCTTGAACATCCGAGTGGTAGATTGCCGGGCCTTTGGACGATACACCC TGGTGGGTTCCCACGCAGTCAGCTCACTGAGGCGCTTCATCTACCGACCTCCAGACC GCTCAGCCCCCAACTGGAACACCACAGGGGAGGTTGTAGTAAGCATGGAGCCTGAG GAGCCAGTTAAGAAGCTGGAGACCATGGTGAAACTGGATGCGACTTCTGATGCTGT GGTCAAGGTGGATGTGGCTGAAGATGAGAAGGAAAGGAAGAAGAAGAAAAAGAAA GGCCCGTCAGAGGAGCCAGAGGAGGAAGAGCCCGATGAGAGCATGCTGGATTGGT GGTCCAAGTACTTCGCCTCCATCGACACAATGAAGGAGCAACTTCGACAACATGAG

ACCTCTGGAACTGACTTGGAAGAGAAGGAAGAGATGGAAAGCGCTGAGGGCCTGA
AGGGACCAATGAAGAGCAAGGAGAAGTCCAGAGCTGCAAAGGAGGAGAAAAAGA
AGAAAAACCAGAGCCCTGGCCCTGGCCAGGGATCGGAGGCTCCTGAGAAGAAGAA
AGCCAAGATCGATGAGCTTAAGGTGTACCCCAAGGAGCTGGAATCGGAGTTTGACA
GCTTTGAGGACTGGCTGCACACCTTCAACCTGTTGAGGGGCAAGACGGGAGATGAT
GAGGATGGCTCCACAGAGGAGGAGCGCATAGTAGGCCGATTCAAGGGCTCCCTCTG
TGTGTACAAAGTGCCACTCCCAGAAGATGTATCTCGAGAAGCTGGCTATGATCCCAC
CTATGGAATGTTCCAGGGCATCCCAAGCAATGACCCCATCAATGTGCTGGTCCGAAT
CTATGTGGTCCGGGCCACAGACCTGCACCCGGCCGACATCAATGGCAAAGCTGACC
CCTATATTGCCATCAAGTTAGGCAAGACCGACATCCGAGACAAGGAGAACTACATC
TCCAAGCAGCTCAACCCTGTGTTTGGGAAGTCCTTTGACATTGAGGCCTCCTTCCCC
ATGGAGTCCATGTTGACAGTGGCCGTGTACGACTGGGATCTGGTGGGCACTGATGA
CCTCATCGGAGAAACCAAGATTGACCTGGAAAACCGCTTCTACAGCAAGCATCGCG
CCACCTGCGGCATCGCACAGACCTATTCCATACATGGCTACAATATCTGGAGGGACC
CCATGAAGCCCAGCCAGATCCTGACACGCCTCTGTAAAGAGGGCAAAGTGGACGGC
CCCCACTTTGGTCCCCATGGGAGAGTGAGGGTTGCCAACCGTGTCTTCACGGGGCCT
TCAGAAATAGAGGATGAGAATGGTCAGAGGAAGCCCACAGATGAGCACGTGGCAC
TGTCTGCTCTGAGACACTGGGAGGACATCCCCCGGGTGGGCTGCCGCCTTGTGCCGG
AACACGTGGAGACCAGGCCGCTGCTCAACCCTGACAAGCCAGGCATTGAGCAGGGC
CGCCTGGAGCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGGACATGCCAGCCCCTGGGACACCT
CTGGATATATCCCCCAGGAAACCCAAGAAGTACGAGCTGCGGGTCATCGTGTGGAA
CACAGACGAGGTGGTCCTGGAAGACGATGATTTCTTCACGGGAGAGAAGTCCAGTG
ACATTTTTGTGAGGGGGTGGCTGAAGGGCCAGCAGGAGGACAAACAGGACACAGAT
GTCCACTATCACTCCCTCACGGGGGAGGGCAACTTCAACTGGAGATACCTCTTCCCC
TTCGACTACCTAGCGGCCGAAGAGAAGATCGTTATGTCCAAAAAGGAGTCTATGTTC
TCCTGGGATGAGACGGAGTACAAGATCCCTGCGCGGCTCACCCTGCAGATCTGGGA
CGCTGACCACTTCTCGGCTGACGACTTCCTGGGGGCTATCGAGCTGGACCTGAACCG
GTTCCCGAGGGGCGCTAAGACAGCCAAGCAGTGCACCATGGAGATGGCCACCGGGG
AGGTGGACGTACCCCTGGTTTCCATCTTTAAACAGAAACGTGTCAAAGGCTGGTGGC
CCCTCCTGGCCCGCAATGAGAATGATGAGTTTGAGCTCACAGGCAAAGTGGAGGCG
GAGCTACACCTACTCACGGCAGAGGAGGCAGAGAAGAACCCTGTGGGCCTGGCTCG
CAATGAACCTGATCCCCTAGAAAAACCCAACCGGCCTGACACGGCATTCGTCTGGTT
CCTGAACCCACTCAAATCTATCAAGTACCTCATCTGCACCCGGTACAAGTGGCTGAT
CATCAAGATCGTGCTGGCGCTGCTGGGGCTGCTCATGCTGGCCCTCTTCCTTTACAG
CCTCCCAGGCTACATGGTCAAGAAGCTCCTAGGGGCCTGA

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

Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать первый вектор с 5' кодирующей областью OTOF, которая содержит экзоны с 1 по (и до) 21 кДНК OTOF. Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать первый вектор, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 101 (или последовательность, которая на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 101). Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать первый вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, которая на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 101, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению включает первый вектор, который содержит кодон-оптимизированную версию SEQ ID NO: 101, т. е. нуклеотидную последовательность, кодирующую ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 101, но кодон-оптимизированную для экспрессии в конкретном типе клеток, например, в клетке млекопитающего, например, в клетке человека. В некоторых вариантах осуществления, первый вектор не включает какую-либо другую часть гена OTOF. В некоторых вариантах осуществления, первый вектор не включает какую-либо другую часть кДНК OTOF.

Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать второй вектор с 3’ кодирующей областью OTOF, которая содержит экзоны с 22 по (и до) экзон 48 кДНК OTOF. Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать второй вектор, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 108 (или последовательность, которая на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 108). Некоторые варианты осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать второй вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, которая на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 108, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению включает второй вектор, который содержит кодон-оптимизированную версию SEQ ID NO: 108, т. е. нуклеотидную последовательность, кодирующую ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 108, но кодон-оптимизированную для экспрессии в конкретном типе клеток, например, в клетке млекопитающего, например, в клетке человека. В некоторых вариантах осуществления, второй вектор не включает какую-либо другую часть гена OTOF. В некоторых вариантах осуществления, второй вектор не включает какую-либо другую часть кДНК OTOF.

Векторы

В настоящем документе предложены композиции вещества и способы применения для лечения такого заболевания, как внесиндромная потеря слуха, с использованием терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот, таких как матричные РНК слуховых полипептидов. Предпочтительно, нуклеиновые кислоты слухового полипептида присутствуют в вирусных векторах, таких как аденоассоциированные вирусные векторы, аденовирусные векторы, лентивирусные векторы и ретровирусные векторы.

Вышеупомянутые способы упаковки рекомбинантных векторов в требуемые капсиды AAV для получения rAAV (или частиц rAAV) по настоящему изобретению не предназначены для ограничения, и специалисту в данной области техники будут очевидны другие подходящие способы.

Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Большое количество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцируемыми и/или тканеспецифическими, известны в данной области техники и могут быть использованы.

Как используется в настоящем документе, последовательность нуклеиновой кислоты (например, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности считаются «функционально» связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, что экспрессия или транскрипция последовательности нуклеиновой кислоты находится под влиянием или контролем регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательности нуклеиновых кислот транслировались в функциональный белок, две последовательности ДНК считаются функционально связанными, если индукция промотора в 5' регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя последовательностями ДНК не приводит (1) к введению мутации со сдвигом рамки, (2) препятствует способности промоторной области направлять транскрипцию кодирующих последовательностей или (3) препятствует способности соответствующего РНК транскрипта для трансляции в белок. Таким образом, промоторная область может быть функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, если промоторная область способна осуществлять транскрипцию этой последовательности ДНК, так что полученный транскрипт может быть транслирован в желаемый белок или полипептид. Подобным образом, две или несколько кодирующих областей функционально связаны, когда они связаны таким образом, что их транскрипция с общего промотора приводит к экспрессии двух или нескольких белков, транслированных в рамке. В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные кодирующие последовательности дают слитый белок. В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные кодирующие последовательности дают функциональную РНК (например, кшРНК, микроРНК, ингибитор микроРНК).

Для нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность полиаденилирования обычно вставляется после последовательностей трансгена и перед последовательностью 3’ AAV ITR. Конструкция rAAV, используемая в настоящем описании, может также содержать интрон, желательно расположенный между последовательностью промотора/энхансера и трансгеном. Одна возможная последовательность интрона получена из SV-40 и называется последовательностью T-интрона SV-40. Одна возможная последовательность интрона имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 100. Другим элементом вектора, который можно использовать, является участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более чем одного полипептида из транскрипта одного гена. Последовательность IRES может быть использована для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других общих векторных элементов является общепринятым, и многие такие последовательности доступны [см., например, Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989), и цитированные там ссылки, например, на страницах 3.18 3.26 и 16.17 16.27 и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В некоторых вариантах осуществления, последовательность вируса ящура 2A включена в полипротеин; она представляет собой небольшой пептид (примерно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Расщепляющая активность последовательности 2A ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и векторы генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931; и Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Точная природа регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов в клетках-хозяевах, может различаться в зависимости от вида, ткани или типа клеток, но в целом должна включать, при необходимости, 5' нетранскрибируемые и 5' нетранслируемые последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, соответственно, такие как TATA-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность CAAT, энхансерные элементы и подобные. В частности, такие 5' нетранскрибируемые регуляторные последовательности будут включать промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально присоединенного гена. Регуляторные последовательности могут также включать энхансерные последовательности или вышестоящие активаторные последовательности по желанию. Векторы по настоящему изобретению могут необязательно включать 5' лидерную или сигнальную последовательности. Выбор и дизайн соответствующего вектора находится в пределах возможностей и усмотрения специалиста в данной области техники.

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

Индуцируемые промоторы позволяют регулировать экспрессию генов и могут регулироваться экзогенно доставляемыми соединениями, факторами окружающей среды, такими как температура, или наличием определенного физиологического состояния, например, острой фазы, определенного состояния дифференциации клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из различных коммерческих источников, включая, без ограничений, Invitrogen, Clontech и Ariad. Описаны многие другие системы, которые могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно обеспечиваемыми промоторами, включают индуцируемый цинком промотор металлотионина овцы (MT), индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); экдизоновый промотор насекомых (No et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351), тетрациклин-репрессируемая система (Gossen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемая система (Gossen et al. Science, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al. Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), RU486-индуцируемая система (Wang et al. Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al. Gene Ther., 4:432-441 (1997)) и рапамицин-индуцируемая система (Magari et al. J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другие типы индуцируемых промоторов, которые могут быть использованы в этом контексте, представляют собой те, которые регулируются определенным физиологическим состоянием, например, температурой, острой фазой, конкретным состоянием дифференциации клетки или только в реплицирующихся клетках.

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

В некоторых вариантах осуществления, регуляторные последовательности придают способность экспрессировать тканеспецифические гены. В некоторых случаях, тканеспецифичные регуляторные последовательности связывают тканеспецифические факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом. Такие тканеспецифичные регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Примеры тканеспецифических регуляторных последовательностей включают, но не ограничены ими, следующие тканеспецифические промоторы: промотор печень-специфического тироксинсвязывающего глобулина (TBG), промотор инсулина, промотор глюкагона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn) (Kugler et al., Virology 311:89-95, 2003; Hioki et al., Gene Ther. 14:872-882, 2007; Kuroda et al., J. Gene Med. 10:1163-1175, 2008), промотор креатинкиназы (MCK) (Wang et al., Gene Ther. 15:1489-1499, 2008; Talbot et al., Mol. Ther. 18:601-608, 2010; Katwal et al., Gene Ther. 20(9):930-938, 2013), промотор десмина (DES) млекопитающих (Talbot et al., Mol. Ther. 18:601-608, 2010), C5-12 промотор (Wang et al., Gene Ther. 15:1489-

1499, 2008), промотор тяжелой цепи α-миозина (a-MHC), промотор PDGF (Patterna, Gene Ther. 7(15):1304-1311, 2000; Hioki et al., Gene Ther. 14:872-882, 2007), промотор MecP2 (Rastegar et al., PLoS One 4:e6810, 2009; Gray et al., Human Gene Ther. 22:1143-1153, 2011), промотор CaMKII (Hioki et al., Gene Ther. 14:872-882, 2007; Kuroda et al., J. Gene Med. 10:1163-1175, 2008), промотор mGluR2 (Brene et al., Eur. J. Eurosci. 12:1525-1533, 2000; Kuroda et al., J. Gene Med. 10:1163-1175, 2008), промотор NFL (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001), промотор NFH (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001), промотор nJ2 (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001), промотор PPE (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001), промотор Enk (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001), промотор EAAT2 (Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:1955-1960, 2003; Kuroda et al., J. Gene Med. 10:1163-1175, 2008), промотор GFAP (Brenner et al. al., J. Neurosci., 14:1030-1037, 1994; Xu et al., Human Gene Ther., 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther., 8:1323-1332, 2001; Lee et al., Glia 56:481-493, 2008; Dirren et al., Human Gen*e Тер*. 25:109-120, 2014), промотор MBP (Chen et al., Gene Ther. 5(1):50-58, 1998) или промотор сердечного тропонина T (cTnT). Другие типиовые промоторы включают промотор бета-актина, основной промотор вируса гепатита B, Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); промотор альфа-фетопротеина (AFP), Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), промотор костного остеокальцина (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); промотор костного сиалопротеина (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), промотор CD2 (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина, промотор альфа-цепи T-клеточного рецептора, промотор нейрональной, такой как нейрон-специфическая, енолазы (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993); Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther., 8:1323-1332, 2001), промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), и нейрон-специфический промотор гена vgf (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)), среди прочих, которые будут очевидны для специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько сайтов связывания для одной или нескольких микроРНК включены в трансген вектора rAAV для ингибирования экспрессии трансгена в одной или нескольких тканях субъекта, несущих трансген. Специалисту в данной области техники понятно, что сайты связывания могут быть выбраны для контроля экспрессии трансгена тканеспецифическим образом. Например, сайты связывания печень-специфичной miR-122 могут быть включены в трансген для ингибирования экспрессии этого трансгена в печени. Сайты-мишени в мРНК могут находиться в 5' UTR, 3’ UTR или в кодирующей области. Как правило, сайт-мишень находится в 3’ UTR мРНК. Кроме того, трансген может быть сконструирован таким образом, что несколько микроРНК регулируют мРНК, распознавая один и тот же или несколько сайтов. Наличие нескольких сайтов связывания микроРНК может приводить к совместному действию нескольких RISC и обеспечивать высокоэффективное ингибирование экспрессии. Последовательность сайта-мишени может содержать всего 5-100, 10-60 или более нуклеотидов. Последовательность сайта-мишени может содержать, по меньшей мере, 5 нуклеотидов последовательности сайта связывания гена-мишени.

Слуховые полипептиды и кодирующие последовательности трансгена слухового полипептида

Композиция трансгенной последовательности слухового полипептида вектора rAAV будет зависеть от применения, для которого будет создан полученный вектор. Таким образом, изобретение охватывает доставку векторов rAAV, кодирующих один или несколько слуховых полипептидов, пептидов или белков, которые применимы для лечения или профилактики болезненных состояний, связанных с потерей слуха, у субъекта-млекопитающего. Примеры терапевтических белков включают один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей из отоферлина, $Ca_v1.3$, каркасного белка, выбранного из фагота, пикколо, рибай и гармонина, Vglut3, синаптотагмина, белка прикрепления/докинга везикул, белка примирования везикул, белок слияния везикул, GluA2/3 или GluA4.

Необязательно, в состав композиций AAV включены полипептидные репортерные белки. Репортерные последовательности, которые могут быть представлены в трансгене, включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие.бета.-лактамазу, .бета.-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), люциферазу и другие, хорошо известные в данной области техники. При связывании с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, репортерные последовательности обеспечивают сигналы, обнаруживаемые обычными способами, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы, анализы сортировки флуоресцентно активированных клеток и иммунологические анализы, включая твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию. Например, когда маркерная последовательность представляет собой ген LacZ, присутствие вектора, несущего сигнал, обнаруживают с помощью анализов активности J-галактозидазы. Когда трансген представляет собой зеленый флуоресцентный белок или люциферазу, вектор, несущий сигнал, может быть измерен визуально по продуцированию цвета или света в люминометре. Такие репортеры могут быть, например, полезны для проверки способности тканеспецифического таргетирования и регуляторной активности тканеспецифического промотора rAAV.

В другом примере, трансген кодирует белок или функциональную РНК, предназначенную для использования для создания животной модели заболевания. Подходящие последовательности, кодирующие трансген, очевидны специалисту в данной области техники.

Векторы rAAV могут содержать ген или часть гена, кодирующего слуховой полипептид, для переноса субъекту для лечения заболевания, связанного со сниженной экспрессией, отсутствием экспрессии или дисфункцией гена слухового полипептида или другого гена в функциональном пути слухового полипептида.

В первом аспекте, предложены терапевтические композиции, включающие множество векторов аденоассоциированного вируса (AAV), где множество векторов AAV способны образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию. Предпочтительно, множество векторов AAV способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию. Множество векторов AAV включает в себя первый вектор AAV и второй вектор AAV, где первый и второй векторы AAV независимо содержат упаковочную способность менее примерно 6 т.н. Слуховой полипептид матричной РНК кодирует слуховой полипептид, выбранный из группы, состоящей из отоферлина и его ортолога или гомолога, например, как предложено в настоящем документе. Векторы AAV содержат, по меньшей мере, одну промоторную последовательность, выбранную из промотора CBA, CMV или CB7, или одного или нескольких промоторов, специфичных для улитки. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV может включать последовательность энхансера и промотора CMV, например, SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV может включать энхансер CMV и промотор β-актина курицы (CBA), например, SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV может включать последовательность промотора CMVd, например, SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV может включать промотор, который содержит энхансер CMV и промотор CBA, например, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 98 и 99. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 98 предшествует нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 99 и, необязательно, за ней следует химерный интрон, например, нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 100.

Композиции, представленные в настоящем документе, включают, по меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять или шесть) векторов нуклеиновой кислоты, где: каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, каждая из кодируемых частей содержит, по меньшей мере, 30 аминокислот (например, от примерно 30 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно

30 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 250 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 30 аминокислот до примерно 50 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 550

аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 250 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 50 аминокислот до примерно 100 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 250 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 100 аминокислот до примерно 150 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 250 аминокислот, от примерно 150 аминокислот до примерно 200 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно

650 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 200 аминокислот до примерно 250 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 250 аминокислот до примерно 300 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно

300 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 300 аминокислот до примерно 350 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 350 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно

400 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 450 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 800 аминокислот,

от примерно 450 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 450 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 550 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 550 аминокислот до примерно 600 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 600 аминокислот до примерно 650 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 650 аминокислот до примерно 700 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 700 аминокислот до примерно 750 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 750 аминокислот до примерно 800 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 800 аминокислот до примерно 850 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 850 аминокислот до примерно 900 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно

1900 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1850 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1850 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1900 аминокислот до примерно 1950 аминокислот), где аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей; ни один из, по меньшей мере, двух различных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин дикого типа)); и при введении в клетку млекопитающего, по меньшей мере, два разных вектора подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, где рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). В некоторых вариантах осуществления, один из векторов нуклеиновой кислоты может включать кодирующую последовательность, которая кодирует часть белка отоферлина, где кодируемая часть имеет длину, например, от примерно 900 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 900 аминокислот до примерно 950 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 950 аминокислот до примерно 1000 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 1000 аминокислот до примерно 1050 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно

1300 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1050 аминокислот до примерно 1100 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1100 аминокислот до примерно 1150 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1150 аминокислот до примерно 1200 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1200 аминокислот до примерно 1250 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1250 аминокислот до примерно 1300 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1300 аминокислот до примерно 1350 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1350 аминокислот до примерно 1400 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1400 аминокислот до примерно 1450 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1450 аминокислот до примерно 1500 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1500 аминокислот до примерно 1550 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1550 аминокислот до примерно 1600 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1600 аминокислот до примерно 1650 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1650 аминокислот до примерно 1700 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1700 аминокислот до примерно 1750 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1750 аминокислот до примерно 1800 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, от примерно 1800 аминокислот до примерно 1850 аминокислот, от примерно 1850 аминокислот до примерно 1950 аминокислот, от примерно 1850 аминокислот до примерно 1900 аминокислот, or от примерно 1900 аминокислот до примерно 1950 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления этих композиций, по меньшей мере, одна из кодирующих последовательностей включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК отоферлина, и не содержит интронную последовательность, которая в природе встречается между двумя соседними экзонами.

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

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

В некоторых примерах, векторы включают два разных вектора, каждый из которых содержит не только экзон(ы), но также и другой сегмент интрона, где интрон включает нуклеотидную последовательность интрона, которая присутствует в геномной ДНК отоферлина (например, любой из иллюстративных интронов в SEQ ID NO: 12, описанных в настоящем документе), и где два разных сегмента перекрываются по последовательности, по меньшей мере, на длину 100 нуклеотидов (например, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 800 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 600 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 400 нуклеотидов, от примерно 100 нуклеотидов до примерно 200 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 800 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 600 нуклеотидов, от примерно 200 нуклеотидов до примерно 400 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 800 нуклеотидов, от примерно 400 нуклеотидов до примерно 600 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 600 нуклеотидов до примерно 800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 1500 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 1500 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 2500 нуклеотидов, от примерно 2500 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2500 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 2500 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2500 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 2500 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 3500 нуклеотидов, от примерно 3500 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3500 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 3500 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 4500 нуклеотидов, от примерно 4500 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов).

Перекрывающаяся нуклеотидная последовательность в любых двух различных векторах может включать часть или все из одного или несколько экзонов гена отоферлина (например, любой один или несколько иллюстративных экзонов в SEQ ID NO: 12, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления, количество различных векторов в композиции равно двум, трем, четырем или пяти. В композициях, где количество разных векторов в композиции равно двум, первый из двух разных векторов может включать кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина. В некоторых примерах длина N-концевой части гена отоферлина составляет от примерно 30 до примерно 1950 аминокислот (или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанных выше). В некоторых примерах, первый вектор дополнительно включает один или оба промотора (например, любой из промоторов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники) и последовательность Козака (например, любую из типовых последовательностей Козака, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). В некоторых примерах, первый вектор включает промотор, который является индуцируемым промотором, конститутивным промотором или тканеспецифическим промотором. В некоторых примерах, второй из двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина. В некоторых примерах, длина C-концевой части белка отоферлина составляет от 30 до примерно 1950 аминокислот (или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанных выше). В некоторых примерах, второй вектор дополнительно включает сигнальную последовательность poly(A).

В некоторых примерах, где количество разных векторов в композиции равно двум, N-концевая часть, кодируемая одним из двух векторов, может включать часть, содержащую от аминокислоту в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1950, аминокислоты в положении примерно 1940, аминокислоты в положении примерно 1930, аминокислоты в положении примерно 1920, аминокислоты в положении примерно 1910, аминокислоты в положении примерно 1900, аминокислоты в положении примерно 1900, аминокислоты в положении примерно 1890, аминокислоты в положении примерно 1880, аминокислоты в положении примерно 1870, аминокислоты в положении примерно 1860, аминокислоты в положении примерно 1850, аминокислоты в положении примерно

1840, аминокислоты в положении примерно 1830, аминокислоты в положении примерно 1820, аминокислоты в положении примерно 1810, аминокислоты в положении примерно 1800, аминокислоты в положении примерно 1790, аминокислоты в положении примерно 1780, аминокислоты в положении примерно 1770, аминокислоты в положении примерно 1760, аминокислоты в положении примерно 1750, аминокислоты в положении примерно 1740, аминокислоты в положении примерно 1730, аминокислоты в положении примерно 1720, аминокислоты в положении примерно 1710, аминокислоты в положении примерно 1700, аминокислоты в положении примерно, аминокислоты в положении примерно 1690, аминокислоты в положении примерно 1680, аминокислоты в положении примерно 1670, аминокислоты в положении примерно 1660, аминокислоты в положении примерно 1650, аминокислоты в положении примерно 1640, аминокислоты в положении примерно 1630, аминокислоты в положении примерно 1620, аминокислоты в положении примерно 1610, аминокислоты в положении примерно 1600, аминокислоты в положении примерно 1590, аминокислоты в положении примерно 1580, аминокислоты в положении примерно 1570, аминокислоты в положении примерно 1560, аминокислоты в положении примерно 1550, аминокислоты в положении примерно 1540, аминокислоты в положении примерно 1530, аминокислоты в положении примерно 1520, аминокислоты в положении примерно 1510, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1500, аминокислоты в положении примерно 1490, аминокислоты в положении примерно 1480, аминокислоты в положении примерно 1470, аминокислоты в положении примерно 1460, аминокислоты в положении примерно 1450, аминокислоты в положении примерно 1440, аминокислоты в положении примерно 1430, аминокислоты в положении примерно 1420, аминокислоты в положении примерно 1410, аминокислоты в положении примерно 1400, аминокислоты в положении примерно 1390, аминокислоты в положении примерно 1380, аминокислоты в положении примерно 1370, аминокислоты в положении примерно 1360, аминокислоты в положении примерно 1350, аминокислоты в положении примерно 1340, аминокислоты в положении примерно 1330, аминокислоты в положении примерно 1320, аминокислоты в положении примерно 1310, аминокислоты в положении примерно 1300, аминокислоты в положении примерно 1290, аминокислоты в положении примерно 1280, аминокислоты в положении примерно 1270, аминокислоты в положении примерно 1260, аминокислоты в положении примерно 1250, аминокислоты в положении примерно 1240, аминокислоты в положении примерно 1230, аминокислоты в положении примерно 1220, аминокислоты в положении примерно 1210, аминокислоты в положении примерно 1200, аминокислоты в положении примерно 1190, аминокислоты в положении примерно 1180, аминокислоты в положении примерно 1170, аминокислоты в положении примерно 1160, аминокислоты в положении примерно 1150, аминокислоты в положении примерно 1140, аминокислоты в положении примерно 1130, аминокислоты в положении примерно 1120, аминокислоты в положении примерно 1110, аминокислоты в положении примерно 1100, аминокислоты в положении примерно 1090, аминокислоты в положении примерно 1080, аминокислоты в положении примерно 1070, аминокислоты в положении примерно 1060, аминокислоты в положении примерно 1050, аминокислоты в положении примерно 1040, аминокислоты в положении примерно 1030, аминокислоты в положении примерно 1020, аминокислоты в положении примерно 1010, аминокислоты в положении примерно 1000, аминокислоты в положении примерно 990, аминокислоты в положении примерно 980, аминокислоты в положении примерно 970, аминокислоты в положении примерно 960, аминокислоты в положении примерно 950, аминокислоты в положении примерно 940, аминокислоты в положении примерно 930, аминокислоты в положении примерно 920, аминокислоты в положении примерно 910, аминокислоты в положении примерно 900, аминокислоты в положении примерно 890, аминокислоты в положении примерно 880, аминокислоты в положении примерно 870, аминокислоты в положении примерно 860, аминокислоты в положении примерно 850, аминокислоты в положении примерно 840, аминокислоты в положении примерно 830, аминокислоты в положении примерно 820, аминокислоты в положении примерно 810, аминокислоты в положении примерно 800, аминокислоты в положении примерно 790, аминокислоты в положении примерно 780, аминокислоты в положении примерно 770, аминокислоты в положении примерно 760, аминокислоты в положении примерно 750, аминокислоты в положении примерно 740, аминокислоты в положении примерно 730, аминокислоты в положении примерно 720, аминокислоты в положении примерно 710, аминокислоты в положении примерно 700, аминокислоты в положении примерно 690, аминокислоты в положении примерно 680, аминокислоты в положении примерно 670, аминокислоты в положении примерно 660, аминокислоты в положении примерно 650, аминокислоты в положении примерно 640, аминокислоты в положении примерно 630, аминокислоты в положении примерно 620, аминокислоты в положении примерно 610, аминокислоты в положении примерно 600, аминокислоты в положении примерно 590, аминокислоты в положении примерно 580, аминокислоты в положении примерно 570, аминокислоты в положении примерно 560, аминокислоты в положении примерно 550, аминокислоты в положении примерно 540, аминокислоты в положении примерно 530, аминокислоты в положении примерно 520, аминокислоты в положении примерно 510, аминокислоты в положении примерно 500, аминокислоты в положении примерно 490, аминокислоты в положении примерно 480, аминокислоты в положении примерно 470, аминокислоты в положении примерно 460, аминокислоты в положении примерно 450, аминокислоты в положении примерно 440, аминокислоты в положении примерно 430, аминокислоты в положении примерно 420, аминокислоты в положении примерно 410, аминокислоты в положении примерно 400, аминокислоты в положении примерно 390, аминокислоты в положении примерно 380, аминокислоты в положении примерно 370, аминокислоты в положении примерно 360, аминокислоты в положении примерно 350, аминокислоты в положении примерно 340, аминокислоты в положении примерно 330, аминокислоты в положении примерно 320, аминокислоты в положении примерно 310, аминокислоты в положении примерно 300, аминокислоты в положении примерно 290, аминокислоты в положении примерно 280, аминокислоты в положении примерно 270, аминокислоты в положении примерно 260, аминокислоты в положении примерно 250, аминокислоты в положении примерно 240, аминокислоты в положении примерно 230, аминокислоты в положении примерно 220, аминокислоты в положении примерно 210, аминокислоты в положении примерно 200, аминокислоты в положении примерно 190, аминокислоты в положении примерно 180, аминокислоты в положении примерно 170, аминокислоты в положении примерно 160, аминокислоты в положении примерно 150, аминокислоты в положении примерно 140, аминокислоты в положении примерно 130, аминокислоты в положении примерно 120, аминокислоты в положении примерно 110, аминокислоты в положении примерно 100, аминокислоты в положении примерно 90, аминокислоты в положении примерно 80, аминокислоты в положении примерно 70, аминокислоты в положении примерно 60, аминокислоты в положении примерно 50 или аминокислоты в положении примерно 40 белка отоферлина дикого типа (например, SEQ ID NO: 5).

В некоторых примерах, где количество разных векторов в композиции равно двум, N-концевая часть белка-предшественника отоферлина может включать часть, содержащую от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении 310, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 320, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 330, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 340, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 350, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 360, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 370, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 380, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 390, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 400, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 410, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 420, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 430, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 440, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 450, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 460, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 470, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 480, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 490, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 500, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 510, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 520, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 530, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 540, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 550, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 560, от

аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 570, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 580, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 590, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 600, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 610, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 620, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 630, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 640, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 650, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 660, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 670, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 680, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 690, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 700, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 710, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 720, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 730, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 740, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 750, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 760, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 770, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 780, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 790, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 800, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 810, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 820, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 830, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 840, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 850, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 860, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 870, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 880, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 890, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 900, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 910, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 920, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 930, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 940, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 950, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 960, от

аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 970, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 980, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 990, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1000, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1010, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1020, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1030, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1040, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1050, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1060, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1070, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1080, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1090, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1100, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1110, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1120, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1130, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1140, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1150, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1160, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1170, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1180, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1190, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1200, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1210, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1220, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1230, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1240, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1250, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1260, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1270, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1280, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1290, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1300, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1310, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1320, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1330, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1340, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1350, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1360, от

аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1370, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1380, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1390, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1400, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1410, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1420, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1430, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1440, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1450, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1460, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1470, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1480, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1490, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1500, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1510, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1520, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1530, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1540, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1550, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1560, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1570, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1580, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1590, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1600, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1610, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1620, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1630, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1640, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1650, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1660, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1670, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1680, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1690, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1700, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1710, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1720, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1730, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1740, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1750, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1760, от

аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1770, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1780, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1790, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1800, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1810, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1820, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1830, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1840, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1850, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1860, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1870, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1880, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1890, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1900, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1910, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1920, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1930, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1940, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1950, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1960, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1970, от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении примерно 1980 белка отоферлина дикого типа (например, SEQ ID NO: 5).

В некоторых примерах, композиция включает два вектора, где первый из двух векторов включает кодирующую последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 62, и второй из двух векторов включает кодирующую последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 63.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» включает любой генетический элемент, такой как плазмида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т. д., который способен к репликации при связывании с соответствующими контрольными элементами и которые могут передавать последовательности генов между клетками. Таким образом, этот термин включает носители для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления, под полезными векторами понимаются такие векторы, в которых транскрибируемый сегмент нуклеиновой кислоты расположен под транскрипционным контролем промотора.

В некоторых примерах. вектор может представлять собой искусственную хромосому (например, искусственную хромосому человека (HAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC), искусственную хромосому бактерий (BAC) или искусственную хромосому, полученную из P1 (PAC)) или вирусный вектор (например, любые аденовирусные векторы (например, векторы pSV или pCMV), любые ретровирусные векторы, как описано в настоящем документе, и любые векторы Gateway®). Вектор может, например, включать достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином млекопитающего или в системе экспрессии in vitro.

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

Векторы включают все известные в данной области техники, включая космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид. Специалисты в данной области техники смогут выбрать подходящие векторы и клетки млекопитающих для получения любой из описанных в настоящем документе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой плазмиду (т.е. кольцевую молекулу ДНК, которая может автономно реплицироваться внутри клетки). В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой космиду (например, серии pWE и sCos (Wahl et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2160-2164, Evans et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5030-5034).

Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая включает выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области известно множество векторов, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор переноса» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует толковать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединение полилизина, липосомы и подобные. Примеры вирусных векторов переноса включают, но не ограничены ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и подобные.

Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, включающий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Вектор экспрессии включает достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии in vitro. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники, включая космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

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

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой искусственную хромосому дрожжей (YAC) (см., например, Murray et al., Nature 305: 189-193, 1983; Ikeno et al. (1998) Nat. Biotech. 16:431-439, 1998). В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой бактериальную искусственную хромосому (BAC) (например, pBeloBAC11, pECBAC1 и pBAC108L). В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой искусственную хромосому, полученную из P1 (PAC). Примеры искусственной хромосомы известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой вирусный вектор (например, аденоассоциированный вирус, аденовирус, лентивирус и ретровирус). В настоящем документе описаны не ограничивающие примеры вирусных векторов.

Рекомбинантные векторы AAV

«Рекомбинантные векторы AAV» или «rAAV» по настоящему изобретению обычно состоят, как минимум, из трансгена или его части и регуляторной последовательности и, необязательно, 5' и 3’ концевых инвертированных повторов (ITR) AAV. Именно этот рекомбинантный вектор AAV упаковывается в капсидный белок и доставляется в выбранную клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную последовательностям вектора, которые кодируют полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой представляющий интерес генный продукт. Последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, который обеспечивает трансгенную транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой аденоассоциированный вирусный вектор (AAV) (см., например, Asokan et al., Mol. Ther. 20: 699-7080, 2012). «Рекомбинантные векторы AAV» или «rAAV» обычно состоят, как минимум, из трансгена или его части и регуляторной последовательности и, необязательно, 5' и 3’ концевых инвертированных повторов (ITR) AAV. Такой рекомбинантный вектор AAV упаковывают в капсид с образованием частицы rAAV и доставляют в выбранную клетку-мишень (например, внутреннюю волосковую клетку).

ITR

Последовательности AAV вектора обычно содержат цис-действующие 5' и 3’ последовательности инвертированных концевых повторов (см., например, B.J. Carter, в "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, стр. 155-168 (1990)). Последовательности ITR имеют длину примерно 145 нуклеотидов. Предпочтительно, в молекуле используются практически все последовательности, кодирующие ITR, хотя допустима некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей. Способность модифицировать эти последовательности ITR находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Примером такой молекулы, используемой в настоящем изобретении, является «цис-действующая» плазмида, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы фланкированы 5' и 3’ последовательностями ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в настоящее время типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, ITR представляет собой или содержит 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, ITR представляет собой ITR AAV2 дикого типа, например, 5' ITR SEQ ID NO: 97 и 3’ ITR SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, ITR получают из ITR AAV2 дикого типа, и он включает одну или несколько модификаций, например, усечения, делеции, замены или вставки, как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, ITR содержит менее 145 нуклеотидов, например 127, 130, 134 или 141 нуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления, ITR включает 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 или 145 нуклеотидов.

Неограничивающим примером 5' AAV ITR последовательности является SEQ ID NO: 59. Неограничивающим примером 3' ITR AAV последовательности является SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления, векторы и/или конструкции по настоящему описанию включают 5' AAV ITR и/или 3' AAV ITR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность 5' AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления, последовательность 3' AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, последовательность 5' AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 97 и 3' AAV ITR последовательность представляет собой SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, 5' и 3' AAV ITR (например, SEQ ID NO: 97 и 104) фланкируют часть трансгена и/или конструкции, содержащей часть OTOF (например, SEQ ID NO: 101 или 107).

Другие элементы

В дополнение к основным элементам, указанным выше для рекомбинантного вектора AAV, этот вектор также включает обычные контрольные элементы, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, который обеспечивает его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученным по описанию. Используемый в настоящем документе термин «функционально связанные» последовательности включает как последовательности контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют транс или на расстоянии для контроля представляющего интерес гена.

Векторы AAV, как описано в настоящем документе, могут включать любой из регуляторных элементов, описанных в настоящем документе (например, один или несколько промоторов, последовательность polyA и IRES).

Капсиды

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных векторов AAV по настоящему изобретению упакованы в капсид AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, rh8, rh10, rh39, rh43 или Anc80 серотипа или один или несколько его гибридов. В некоторых вариантах осуществления, капсид происходит из предкового серотипа. Например, в некоторых вариантах осуществления, капсид представляет собой капсид Anc80 (например, капсид Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления, капсид содержит полипептид, представленный SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления, капсид содержит полипептид, последовательность которого на, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична полипептиду, представленному последовательностью SEQ ID NO: 109.

Любая комбинация ITR и капсидов может быть использована в рекомбинантных векторах AAV по настоящему изобретению, например, AAV2 ITR дикого типа или варианта и капсид Anc80, ITR AAV2 дикого типа или варианта и капсид AAV6, и т. д. В некоторых вариантах осуществления настоящего описания, частица rAAV представляет собой частицу rAAV2/Anc80, которая содержит капсид Anc80 (например, содержащий полипептид SEQ ID NO: 109), который инкапсидирует вектор нуклеиновой кислоты с ITR AAV2 дикого типа (например, SEQ ID NO: 97 и 104), фланкирующий часть трансгена и/или конструкции, содержащую часть OTOF (например, SEQ ID NO: 101 или 107).

Рекомбинантные AV и лентивирусные векторы

Также предложены терапевтические композиции, включающие один или несколько аденовирусных (AV) векторов, где один или несколько AV векторов способны образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию. Предпочтительно, один или несколько AV векторов способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

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

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой лентивирус (см., например, Matrai et al. (2010) Mol Ther. 18: 477-490; Banasik et al. (2010) Gene Ther. 17:150-7; и Wanisch et al. (2009) Mol. Ther. 17: 1316-32). Лентивирусный вектор относится к вектору, полученному из, по меньшей мере, части генома лентивируса, включая, в частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как представлено в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Неограничивающие лентивирусные векторы, которые можно использовать в клинике, включают технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и подобные. Другие типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалистам в данной области техники.

Термин «лентивирус» относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов тем, что способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительный объем генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они являются одним из наиболее эффективных методов вектора доставки генов. HIV, SIV и FIV, все являются примерами лентивирусов.

Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из, по меньшей мере, части генома лентивируса, включая, в частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как представлено в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, но не ограничены ими, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и подобные. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалистам в данной области техники.

Например, предложены терапевтические композиции, включающие один или несколько лентивирусных векторов, где один или несколько лентивирусных векторов способны образовывать матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления, один или несколько лентивирусных векторов способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени человека, которому вводят терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, первый вектор включает ITR (например, любую из типовых последовательностей ITR, описанных в настоящем документе), промотор и/или энхансер (например, любой из типовых энхансеров и любой из типовых промоторов, описанных в настоящем документе), последовательность интрона гена OTOF (например, гена OTOF человека, например, любую из типовых последовательностей интронов гена OTOF человека, описанных в настоящем документе), последовательность Козака (например, любую из типовых последовательностей Козака, описанных в настоящем документе), и последовательность, кодирующую первую, N-концевую часть белка отоферлина человека (например, любую из типовых последовательностей, кодирующих первую, N-концевую часть белка отоферлина человека, описанную в настоящем документе), последовательность AK (например, любую типовых последовательностей AK, описанных в настоящем документе), и ITR (например, любую из типовых последовательностей ITR, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, второй вектор включает последовательность ITR (например, любую из типовых последовательностей ITR, описанных в настоящем документе), последовательность AK (например, любую из типовых последовательностей AK, описанных в настоящем документе), последовательность акцептора сплайсинга (например, любую из последовательностей акцептора сплайсинга, описанных в настоящем документе), последовательность, кодирующая вторую часть белка отоферлина человека (например, любую из типовых последовательностей, кодирующих вторую, C-концевую часть белка отоферлина человека, описанную в настоящем документе), сигнальную последовательность poly(A) (например, любую из типовых сигнальных последовательностей poly(A), описанных в настоящем документе), последовательность буфера (например, любую из типовых последовательностей буфера, описанных в настоящем документе) и последовательность ITR (например, любую из типовых последовательностей ITR, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB (SEQ ID NO: 39), изображенный на фигурах 11, 17 и 56, или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 39. Вектор pAAV-AK-SA-3'mOTOF-EWB имеет длину 7625 т.н. и имеет последовательность AK в положениях нуклеотидов 2-78, сайт акцептора сплайсинга (SA) в положениях нуклеотидов 79-129, 3’ mOTOF в положениях нуклеотидов 130-3540, C2D в положениях нуклеотидов 490-891, C2E в положениях нуклеотидов 1996-2516, C2F в положениях нуклеотидов 2749-3234, WPRE в положениях нуклеотидов позиции 3595-4188, ген резистентности к ампициллину (AMP) в положениях нуклеотидов 5537-6537, polyA-хвост гормона роста крупного рогатого скота (bGH pA) в положениях нуклеотидов 4212-4422, точку начала репликации (ORI) f1(+), полученную из фага, в положениях нуклеотидов 4674-5133, точку начала репликации (ORI) в положениях нуклеотидов 6787-7012.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-SA-3'mOTOF-EWB (SEQ ID NO: 40), изображенный на фигурах 12, 20 и 54, или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 40. Вектор pAAV-SA-3'mOTOF-EWB имеет длину 7548 т.н. и имеет сайт акцептора сплайсинга (SA) в положениях нуклеотидов 2-52, 3' mOTOF в положениях нуклеотидов 53-3463, C2D в положениях нуклеотидов 413-814, C2E в положениях нуклеотидов 1919-2439, C2F в положениях нуклеотидов 2672-3157, WPRE в положениях нуклеотидов 3518-4111, ген резистентности к ампициллину (AMP) в положениях нуклеотидов 5460-6460, polyA-хвост гормона роста крупного рогатого скота (bGH pA) в положениях нуклеотидов 4135-4345 и точку начала репликации (ORI) f1(+), полученную из фага, в положениях нуклеотидов 4597-5056.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD (SEQ ID NO: 41), изображенный на фигурах 13, 18 и 53, или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 41. Вектор pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD имеет длину 7346 т.н. и имеет последовательность Козака(*) в положениях нуклеотидов 662-667, последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в положениях нуклеотидов 668-1384, P2A в положениях нуклеотидов 1391-1456, последовательность Козака в положениях нуклеотидов 1463-1468, последовательность 5' mOTOF в положениях нуклеотидов 1469-3988, C2A в положениях нуклеотидов 1469-1831, C2B в положениях нуклеотидов 2231-2599, C2C в положениях нуклеотидов 2720-3091, экзон 21 OTOF человека в положениях нуклеотидов 3872-3988, сайт донора сплайсинга (SD) в положениях нуклеотидов 3989-4070, ген резистентности AMP в положениях нуклеотидов 5186-6186, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 4323-4782, ORI в положениях нуклеотидов 6436-6661 и энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 7277-272.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK (SEQ ID NO: 42), изображенный на фигурах 14, 19 и 55, или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 42. pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOTOF-SD-AK имеет длину 7423 т.н. и имеет последовательность Козака(*) в положениях нуклеотидов 662-667, последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в положениях нуклеотидов 668-1384, P2A в положениях нуклеотидов 1391-1456, последовательность Козака в положениях нуклеотидов 1463-1468, последовательность 5' mOTOF в положениях нуклеотидов 1469-3988, C2A в положениях нуклеотидов 1469-1831, C2B в положениях нуклеотидов 2231-2599, C2C в положениях нуклеотидов 2720-3091, экзон OTOF человека 21 в положениях нуклеотидов 3872-3988, сайт донора сплайсинга (SD) в положениях нуклеотидов 3989-4070, последовательность AK в положениях нуклеотидов 4071-4147, ген резистентности к AMP в положениях нуклеотидов 5263-6263, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 4400-4859, ORI в положениях нуклеотидов 6513-6738 и энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 7354-272.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAKOS102 (SEQ ID NO: 43) или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 43. pAKOS102 показан на фигуре 21. Вектор pAKOS102 имеет длину 7006 т.н. и имеет последовательность AAV ITR в положениях нуклеотидов 1-130, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 145-1144, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 1145-1486, промотор ACTB человека в положениях нуклеотидов 1487-1869, последовательность Козака в положениях нуклеотидов 1883-1888, последовательность 5’ изоформы hOTOF 5 в положениях нуклеотидов 1889-4411, последовательность интрона SD в положениях нуклеотидов 4412-4493, AAV2 ITR последовательность в положениях нуклеотидов 4519-4659, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 4734-5189, ген резистентности к KAN в положениях нуклеотидов 5469-6278, и ORI в положениях нуклеотидов 6357-6945.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAKOS104 (SEQ ID NO: 45) или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 45. pAKOS104 показан на фигуре 24. Вектор pAKOS104 имеет длину 7083 т.н. и имеет последовательность AAV ITR в положениях нуклеотидов 1-130, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 145-1144, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 1145-1486, промотор ACTB человека в положениях нуклеотидов 1487-1869, последовательность Козака в положениях нуклеотидов 1883-1888, последовательность 5’ изоформы hOTOF 5 в положениях нуклеотидов 1889-4411, последовательность интрона SD в положениях нуклеотидов 4412-4493, последовательность AK в положениях нуклеотидов 4494-4570, последовательность AAV2 ITR в положениях нуклеотидов 4596-4736, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 4811-5266, ген резистентности к KAN в положениях нуклеотидов 5546-6355 и ORI в положениях нуклеотидов 6434-7022.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAKOS105_GFP (SEQ ID NO: 48), изображенный на фигуре 29, или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 48. Вектор pAKOS105_GFP имеет длину 7761 т.н. и имеет последовательность AAV ITR в положениях нуклеотидов 1-130, последовательность AK в положениях нуклеотидов 145-221, последовательность сайта SA в положениях нуклеотидов 222-272, изоформу последовательности 3’ 5hOTOF в положениях нуклеотидов 273-3740, последовательность T2A в положениях нуклеотидов 3750-3803, последовательность turboGFP в положениях нуклеотидов 3804-4499, сигнал bGH poly(A) в положениях нуклеотидов 4509-4748, спейсерную последовательность фактора VIII в положениях нуклеотидов 4749-5248, последовательность AAV2 ITR в положениях нуклеотидов 5274-5414, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 5489-5944, ген резистентности к KAN в положениях нуклеотидов 6224-7033 и ORI в положениях нуклеотидов 7112-7700.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAKOS109 (SEQ ID NO: 52) или представляет собой вектор, включающий последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100%

идентична SEQ ID NO: 52. pAKOS109 показан на фигурах 36. Вектор pAKOS109 имеет длину 7056 т.н. и имеет последовательность AAV ITR в положениях нуклеотидов 1-130, энхансер цитомегаловируса человека (hCMV) в положениях нуклеотидов 145-524, промотор β-актина курицы в положениях нуклеотидов 527-802, химерный интрон в положениях нуклеотидов 803-1815, последовательность Козака в положениях нуклеотидов 1856-1861, изоформу 5 последовательности 5' hOTOF в положениях нуклеотидов 1862-4384, последовательность интрона SD в положениях нуклеотидов 4385-4466, последовательность AK в положениях нуклеотидов 4467-4543, последовательность AAV2 ITR в положениях нуклеотидов 4569-4709, f1(+)ORI в положениях нуклеотидов 4784-5239, ген резистентности к KAN в положениях нуклеотидов 5519-6328 и ORI в положениях нуклеотидов 6407-6995.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектором является p105 (SEQ ID NO: 85) или вектор, который включает последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 85. p105 вектор имеет длину 4664 т.н. и показан на фигурах 28 и 39.

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой вектор p108, показанный на фигуре 41. Вектор p108 включает в себя спейсерную последовательность FVIII SEQ ID NO: 58 и последовательность энхансера и промотора CMV SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой 1OTOF18.CL1, показанный на фигуре 42. Вектор 1OTOF18.CL1 включает последовательность деградации CL1 SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой 19OTOF48, показанный на фигуре 43.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой 1OTOF20.CL1, показанный на фигуре

44. Последовательность донора сплайсинга интрона 21 в 1OTOF20,CL1 представляет собой SEQ ID NO: 72.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе вектор представляет собой 105.pA.NTF3.CMVd, показанный на фигуре 48. Вектор 105.pA.NTF3.CMVd включает следующие последовательности: polyA SV40 (SEQ ID NO: 76), poly(A) HSV-TK (SEQ ID NO: 77), последовательность, кодирующая NTF3 человека (SEQ ID NO: 79), и CMVd (SEQ ID NO: 86).

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE (SEQ ID NO: 88) или представляет собой вектор, который включает последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 88. Вектор pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE имеет длину 4674 т.н. и показан на фигуре 54. Вектор pAAV-SA-3'mOTOF.WPRE включает AAV ITR

(SEQ ID NO: 59), последовательность акцептора сплайсинга (SEQ ID NO: 65), последовательность, кодирующую часть 3'mOTOF (SEQ ID NO: 95), последовательность WPRE (SEQ ID NO: 69), последовательность BGHpA (SEQ ID NO: 68) и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-AK-SA-3'mOTOF-WPRE, показанный на фигуре 56, и имеет длину 4751 т.н. Вектор pAAV-AK-SA-3'mOTOF-WPRE включает AAV ITR (SEQ ID NO: 59), последовательность AK (SEQ ID NO: 66), последовательность, кодирующую часть 3' mOTOF (SEQ ID NO: 95), последовательность WPRE (SEQ ID NO: 69), последовательность BGHpA (SEQ ID NO: 68) и AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе вектор представляет собой pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP, показанный на фигуре 58, и имеет длину 4540 т.н. pAAV-HBA-5'hOTOF-SD-AP включает последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть 5'hOTOF (SEQ ID NO: 62), последовательность AP rec (SEQ ID NO: 89) и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD, показанный на фигуре 61, и имеет длину 4668 т.н. Вектор pAAV-HBA-5'hOTOFcodop-SD включает последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 59), спейсерную последовательность FVIII (4677-5173) (SEQ ID NO: 90), спейсерную последовательность FVIII (3679-4177). (SEQ ID NO: 91), энхансер CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codop (SEQ ID NO: 92), и последовательность AAV ITR

(SEQ ID NO: 60). В некоторых вариантах осуществления, вектор включает последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления, вектор включает последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе вектор представляет собой pAAV-CMV-5'hOTOF-SD, показанный на фигуре 62, и имеет длину 4490 т.н. Вектор pAAV-CMV-5'hOTOF-SD включает последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 59), две спейсерные последовательности FVIII, энхансера и промотора CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательности 5’OTOF codop (SEQ ID NO: 92), последовательность SD-интрона (SEQ ID NO: 64) и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе вектор представляет собой pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK, показанный на фигуре 63, и имеет длину 4567 т.н. Вектор pAAV-CMV-5'hOTOF-SD-AK включает в себя последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 59), две спейсерные последовательности FVIII, энхансера и промотора CMV (SEQ ID NO: 70), последовательность, кодирующую часть последовательность codop 5'OTOF (SEQ ID NO: 92), последовательность интрона донора сплайсинга (SD) (SEQ ID NO: 64), последовательность AK (SEQ ID NO: 67) и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-CBA-5'hOTOF-SD, показанный на фигуре 65, и имеет длину 4634 т.н. Вектор pAAV-CBA-5'hOTOF-SD включает последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 59), энхансер CMV и промотор бета-актина (SEQ ID NO: 61), химерную интронную последовательность, последовательность, кодирующую часть последовательности 5'OTOF codop (SEQ ID NO: 92), интронную последовательность и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

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

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, описанных в настоящем документе, вектор представляет собой pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop, показанный на фигуре 68, и имеет длину 4664 т.н. Вектор pAAV-AK-SA-3'OTOFcodop включает AAV ITR (SEQ ID NO: 59), последовательность AK (SEQ ID NO: 66), последовательность, кодирующую часть последовательности 3'OTOF codop (SEQ ID NO: 93), последовательность bGH polyA (SEQ ID NO: 68) и последовательность AAV ITR (SEQ ID NO: 60).

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

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

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет(ют) собой транспозон (например, транспозон PiggyBac) и может включать более 200 т.н. В некоторых примерах вектор(ы) представляет(ют) собой транспозон, имеющий общую длину в диапазоне от примерно 1 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 20 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 30 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 40 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 50 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 20 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 30 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 40 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 50 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 10 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 30 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 40 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 50 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 20 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 40 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 50 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 30 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 50 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 40 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 50 т.н. до примерно 60 т.н., от примерно 50 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 50 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 50 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 50 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 60 т.н. до примерно 70 т.н., от примерно 60 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 60 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 60 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 70 т.н. до примерно 80 т.н., от примерно 70 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 70 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 80 т.н. до примерно 90 т.н., от примерно 80 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 90 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 200 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 400 т.н. или от примерно 100 т.н. до примерно 500 т.н.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления искусственная(ые) хромосома(ы) представляет(ют) собой бактериальную искусственную хромосому (BAC) и может иметь общее количество нуклеотидов до 750 т.н. В некоторых вариантах осуществления искусственная(ые) хромосома(ы) представляет(ют) собой BAC и может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 100 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 200 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 150 т.н. до примерно 200 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 250 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 350 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 350 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 350 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 350 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 350 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 450 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 450 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 550 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 550 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 550 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 750 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 700 т.н. или от примерно 650 т.н. до примерно 750 т.н.

В некоторых вариантах осуществления, искусственная(ые) хромосома(ы) представляет(ют) собой искусственную хромосому, происходящую из P1 (PAC), и может иметь общее количество нуклеотидов до 300 т.н. В некоторых вариантах осуществления, искусственная(ые) хромосома(ы), происходящая из P1, может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 100 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 200 т.н. или от примерно 200 т.н. до примерно 300 т.н.

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой вирусный вектор и может иметь общее количество нуклеотидов до 10 т.н. В некоторых вариантах осуществления, вирусный(ые) вектор(ы) может(гут) иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 1 т.н. до примерно 2 т.н., 1 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 7 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 7 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 7 т.н. до примерно 10 т.н., от примерно 8 т.н. до примерно 9 т.н., от примерно 8 т.н. до примерно 10 т.н. или от примерно 9 т.н. до примерно 10 т.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет(ют) собой лентивирус и может иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.н. В некоторых примерах, лентивирус(ы) может(гут) иметь общее количество нуклеотидов от примерно 1 т.н. до примерно 2 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 8т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 7 т.н. или от примерно 7 т.н. до примерно 8 т.н.

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой аденовирус и может(гут) иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.н. В некоторых вариантах осуществления, аденовирус(ы) может(гут) иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 1 т.н. до примерно 2 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 4 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 6 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 5 т.н. до примерно 8 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 7 т.н., от примерно 6 т.н. до примерно 8 т.н. или от примерно 7 т.н. до примерно 8 т.н.

В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) представляет(ют) собой аденоассоциированный вирус (вектор AAV) и может включать общее количество нуклеотидов до 5 т.н. В некоторых вариантах осуществления, вектор(ы) AAV может включать общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 1 т.н. до примерно 2 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 5т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 5 т.н. или от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет(ют) собой вектор Gateway® и может включать общее количество нуклеотидов до 5 т.н. В некоторых вариантах осуществления, каждый вектор Gateway® включает общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 1 т.н. до примерно 2 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 1 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 3 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 2 т.н. до примерно 5 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 4 т.н., от примерно 3 т.н. до примерно 5 т.н. или от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, наборов и способов, предложенных в настоящем документе, по меньшей мере, два разных вектора могут быть по существу векторами одного и того же типа и могут различаться по размеру. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два разных вектора могут быть векторами разных типов и могут иметь по существу одинаковый размер или разные размеры.

В некоторых вариантах осуществления, любой из по меньшей мере, двух векторов может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от примерно 500 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно

500 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 1600 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 1200 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 500 нуклеотидов до примерно 800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно

800 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1600 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1200 нуклеотидов, от примерно 800 нуклеотидов до примерно 1000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 1600 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 1000 нуклеотидов до примерно 1200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до

примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 1600 нуклеотидов, от примерно 1200 нуклеотидов до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 1400 нуклеотидов до примерно 1600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 1600 нуклеотидов до примерно 1800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно

1800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 1800 нуклеотидов до примерно 2000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 2000 нуклеотидов до примерно 2200 нуклеотидов, от примерно 2200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно

3400 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 2400 нуклеотидов до примерно 2600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 2600 нуклеотидов до примерно 2800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 2800 нуклеотидов до примерно 3000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 3000 нуклеотидов до примерно 3200 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно

3200 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 3200 нуклеотидов до примерно 3400 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 3400 нуклеотидов до примерно 3600 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 3600 нуклеотидов до примерно 3800 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 3800 нуклеотидов до примерно 4000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 4000 нуклеотидов до примерно 4200 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 4200 нуклеотидов до примерно 4400 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно

5000 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4400 нуклеотидов до примерно 4600 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 4600 нуклеотидов до примерно 4800 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 4800 нуклеотидов до примерно 5000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 5000 нуклеотидов до примерно 5200 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 5200 нуклеотидов до примерно 5400 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 5400 нуклеотидов до примерно 5600 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 5600 нуклеотидов до примерно 5800 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 5800 нуклеотидов до примерно 6000 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 6000 нуклеотидов до примерно 6200 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 6200 нуклеотидов до примерно 6400 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 6400 нуклеотидов до примерно 6600 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 6600 нуклеотидов до примерно 6800 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 6800 нуклеотидов до примерно 7000 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 7000 нуклеотидов до примерно 7200 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 7200 нуклеотидов до примерно 7400 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 7400 нуклеотидов до примерно 7600 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 7600 нуклеотидов до примерно 7800 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 7800 нуклеотидов до примерно 8000 нуклеотидов, от примерно 8000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 8000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 8000 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 8000 нуклеотидов до примерно 8500 нуклеотидов, от примерно 8500 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 8500 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, от примерно 8500 нуклеотидов до примерно 9000 нуклеотидов, от примерно 9000 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов, от примерно 9000 нуклеотидов до примерно 9500 нуклеотидов, or от примерно 9500 нуклеотидов до примерно 10000 нуклеотидов (включительно).

Для введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, в клетку млекопитающего (например, во внутреннюю волосковую клетку улитки) можно использовать множество различных способов, известных в данной области техники. Неограничивающие примеры способов введения нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего включают: липофекцию, трансфекцию (например, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию с использованием высокоразветвленных органических соединений, трансфекцию с использованием катионных полимеров, трансфекцию на основе дендримера, оптическую трансфекцию, трансфекцию на основе частиц) (например, трансфекцию наночастиц) или трансфекцию с использованием липосом (например, катионных липосом)), микроинъекцию, электропорацию, сдавливание клеток, сонопорацию, слияние протопластов, импалефекцию, гидродинамическую доставку, генную пушку, магнитофекцию, вирусную трансфекцию и нуклеофекцию.

Специалистам в данной области техники понятно, что любой из описанных в настоящем документе векторов можно ввести в клетку млекопитающего, например, путем липофекции.

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

Любой из описанных в настоящем документе векторов может дополнительно включать контрольную последовательность, например, контрольную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (polyA) и консенсусной последовательности Козака. В настоящем документе описаны неограничивающие примеры этих контрольных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, промотор может быть нативным промотором, конститутивным промотором, индуцируемым промотором и/или тканеспецифическим промотором.

Промоторы

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

В некоторых вариантах осуществления, вектор, кодирующий N-концевую часть белка отоферлина (например, белок отоферлин человека), может включать промотор и/или энхансер. Вектор, кодирующий N-концевую часть белка отоферлина, может включать любые промоторы и/или энхансеры, описанные в настоящем документе или известные в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой индуцируемый промотор, конститутивный промотор, промотор клетки млекопитающего, вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифический промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой промотор РНК полимеразы II, такой как промотор РНК полимеразы II млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой промотор РНК полимеразы III, включая, но не ограничиваясь ими, промотор H1, промотор U6 человека, промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Промотор, как правило, будет таким, который способен стимулировать транскрипцию в кохлеарных клетках, таких как волосковые клетки. В некоторых примерах, промотор представляет собой промотор, специфичный для улитки, или промотор, ориентированный на улитку.

В данной области техники известно множество промоторов, которые можно использовать в настоящем документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в настоящем документе, включают: 1α-субъединицу фактора элонгации человека (EF1a) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; Accession No. J04617.1; Gill et al., Gene Ther. 8(20):1539-1546, 2001; Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332; Ikeda et al., Gene Ther. 9:932-938, 2002; Gilham et al., J. Gene Med. 12(2):129-136, 2010), цитомегаловирус (Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332; Gray et al., Human Gene Ther. 22:1143-1153, 2011), немедленно-ранний цитомегаловирус человека (CMV) (патент США № 5,168,062, Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; № доступа X17403.1 или KY490085.1), убиквитин C человека (UBC) (Gill et al., Gene Ther. 8(20):1539-1546, 2001; Qin et al., PLoS One 5(5):e10611, 2010), фосфоглицераткиназу 1 мыши, аденовирус полиомы, вирус 40 обезьян (SV40), β-глобин, β-актин, α-фетопротеин, γ-глобин, βинтерферон, γ-глутамилтрансферазу, вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус саркомы Рауса, инсулин крысы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, металлотионеин II (MT II), амилазу, катепсин, мускариновый рецептор MI, ретровирусный LTR (например, вирус Т-клеточного лейкоза человека HTLV), AAV ITR, интерлейкин-2, коллагеназу, фактор роста тромбоцитов, аденовирус 5 E2, стромелизин, ген MX мыши, белки, регулируемые глюкозой (GRP78 и GRP94), α-2-макроглобулин, виментин, ген MHC класса I H-2к b, HSP70, пролиферин, фактор некроза опухоли, ген α-тиреотропного гормона, легкую цепь иммуноглобулина, рецептор Т-клеток, HLA DQα и DQβ, рецептор интерлейкина-2, MHC класса II, MHC класса II HLA-DRα, мышечную креатинкиназу, преальбумин (транстиретин), эластазу I, ген альбумина, c-fos, c-HA-ras, молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), гистон H2B (TH2B), гормон роста крысы, сывороточный амилоид человека (SAA), тропонин I (TN I), мышечную дистрофию Дюшенна, вирус иммунодефицита человека, промоторы вируса лейкоза гиббонов (GALV), промотор HNRPA2B1-CBX1 (UCOE) (Powell and Gray (2015) Discov. Med. 19(102): 49-57; Antoniou et al., Human Gene Ther. 24(4):363-374, 2013), β-глюкуронидазу (GUSB) (Husain et al., Gene Ther. 16:927-932, 2009), куриный β-актин (CBA) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; Stone et al.(2005) Mol. Ther. 11(6): 843-848; Klein et al., Exp.Neurol.176 (1):66-74, 2002; Ohlfest et al., Blood 105:2691-2698, 2005; Gray et al., Human Gene Ther. 22:1143-1153, 2011), промотор β-актина человека (HBA) (№ доступа Y00474.1), миозин VIIA мыши (musMyo7) (Boeda et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10(15): 1581-1589; № доступа AF384559.1), миозин человека VIIA (hsMyo7) (Boeda et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10(15): 1581-1589; № доступа NG_009086.1), поли(ADP-рибоза)полимеразу 2 мыши (musPARP2) (Ame et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(14): 11092-11099; № доступа AF191547.1), поли(ADP-рибоза)полимеразу 2 человека (hsPARP2) (Ame et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (14): 11092-11099; № доступа X16612.1 или AF479321.1), эпсилон-субъединицу ацетилхолинового рецептора (AChε) (Duclert et al. (1993) PNAS 90(7): 3043-3047; № доступа S58221.1 или CR933736.12), вирус саркомы Рауса (RSV) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; № доступа M77786.1), (GFAP) (Liu et al. (2007) Exp. Mol. Med. 39(2): 170-175; Stone et al. (2005) Mol. Ther. 11(6): 843-848; № доступа NG_008401.1 или M67446.1), hAAT (Van Linthout et al., Human Gene Ther. 13(7):829-840, 2002; Cunningham et al., Mol. Ther. 16(6):1081-1088, 2008) и гибрид CBA (CBh) (Gray et al. (2011) Hum. Gen. Therapy 22: 1143-1153; № доступа KF926476.1 или KC152483.1). Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники. См., например, Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой немедленно-ранний промотор CMV.

В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA. В некоторых вариантах осуществления, вектор или конструкция по настоящему описанию содержит промотор CAG. В некоторых вариантах осуществления, промотор CAG содержит, по порядку от 5' до 3', нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 98, 99 и 100. В некоторых таких вариантах осуществления, промотор CAG содержит ранний энхансерный элемент CMV (например, SEQ ID NO: 98), последовательность гена бета-актина курицы (CBA) (например, SEQ ID NO: 99) и химерную последовательность сплайсинга интрон/3' из гена бета-глобина кролика (например, SEQ ID NO: 100).

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

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

Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая при функциональной связи с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим генный продукт, вызывает продуцированиие генного продукта в клетке в большинстве или во всех физиологических условиях клетки.

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

Термин «индуцируемый» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая при функциональной связи с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим генный продукт, вызывает образование генного продукта в клетке по существу только тогда, когда индуктор, соответствующий промотору, присутствует в клетке.

Индуцируемые промоторы позволяют регулировать экспрессию генов и могут регулироваться экзогенно доставляемыми соединениями, факторами окружающей среды, такими как температура, или наличием определенного физиологического состояния, например, острой фазы, определенного состояния дифференциации клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из различных коммерческих источников, включая, помимо прочего, Invitrogen, Clontech и Ariad. Дополнительные примеры индуцируемых промоторов известны в данной области техники.

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

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

Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая при функциональной связи с полинуклеотидом, кодирующим или обнаруживаемым геном, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по существу только в том случае, если клетка является клеткой типа ткани, соответствующей промотору.

Термин «регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию генного продукта, функционально связанного с регуляторной последовательностью. В некоторых случаях, эта последовательность может представлять собой энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию генного продукта.

В некоторых вариантах осуществления, регуляторные последовательности придают возможности экспрессии тканеспецифических генов. В некоторых случаях, тканеспецифичные регуляторные последовательности связывают тканеспецифические факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом.

В некоторых вариантах осуществления, тканеспецифический промотор представляет собой промотор, специфичный для улитки. В некоторых вариантах осуществления, тканеспецифический промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток улитки. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для волосковых клеток улитки, включают, но не ограничены ими: промотор ATOH1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор α9ACHR и промотор α10ACHR.

Энхансеры и 5' Кэп

В некоторых случаях, вектор может включать промоторную последовательность и/или энхансерную последовательность. Термин «энхансер» относится к нуклеотидной последовательности, которая может повышать уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок (например, белок отоферлин). Энхансерные последовательности (длиной 50-1500 пар оснований) обычно повышают уровень транскрипции за счет предоставления дополнительных сайтов связывания для белков, связанных с транскрипцией (например, факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления, энхансерная последовательность находится в интронной последовательности. В отличие от промоторных последовательностей, энхансерные последовательности могут действовать на гораздо большем расстоянии от сайта начала транскрипции (например, по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и энхансер SV40. Пример энхансера CMV описан, например, в Boshart et al., Cell 41(2):521-530, 1985.

Используемый в настоящем документе 5' кэп (также называемый РНК-кэп, РНК-7-метилгуанозиновый кэп или РНК m.sup.7G кэп) представляет собой модифицированный нуклеотид гуанина, который был добавлен к «переднему» или 5' концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5' кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибируемым нуклеотидом. Его присутствие имеет решающее значение для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит ко-транскрипционно, так что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции, 5' конец синтезируемой мРНК связывается кэп-синтезирующим комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментативный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многостадийная биохимическая реакция. Кэпирующую группу можно модифицировать для модулирования функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

Poly(A) последовательности

В некоторых вариантах осуществления, любой из представленных в настоящем документе векторов может включать poly(A) последовательность. Большинство зарождающихся эукариотических мРНК имеют poly(A) хвост на 3' конце, который добавляется во время сложного процесса, включающего расщепление первичного транскрипта и сопряженную реакцию полиаденилирования (см., например, Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002). Poly(A) хвост придает мРНК стабильность и переносимость (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994). В некоторых вариантах осуществления, poly(A) последовательность расположена 3' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей С-конец белка отоферлина.

Используемый в настоящем документе термин «полиаденилирование» относится к ковалентному связыванию полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. В эукариотических организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) полиаденилированы на 3' конце. 3' poly(A) хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленную к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариот, poly(A) хвост добавляется к транскриптам, содержащим специфическую последовательность, сигнал полиаденилирования. Poly(A) хвост и связанный с ним белок помогают защитить мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также важно для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре сразу после транскрипции ДНК в РНК, но, кроме того, может происходить и позже в цитоплазме. После прекращения транскрипции, цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA рядом с сайтом расщепления. После расщепления мРНК, остатки аденозина добавляются к свободному 3' концу в месте расщепления.

Используемый в настоящем документе термин «poly(A) сигнальная последовательность» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и присоединение ряда аденозинов к 3' концу расщепленной мРНК.

Используемый в настоящем документе термин «poly(A)» представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте конструкции для временной экспрессии, polyA составляет от 50 до 5000, предпочтительно, больше 64, более предпочтительно, больше 100, наиболее предпочтительно, больше 300 или 400. Последовательности poly(A) могут быть модифицированы химически или ферментативно для модулирования функциональных возможностей мРНК, таких как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Существует несколько poly(A) сигнальных последовательностей, которые можно использовать, в том числе полученные из гормона роста крупного рогатого скота (bgh) (Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81(13):3944-3948, 1984; U.S. Patent No. 5,122,458; Yew et al., Human Gene Ther. 8(5):575-584, 1997; Xu et al., Human Gene Ther. 12(5):563-573, 2001; Xu et al., Gene Ther. 8:1323-1332, 2001; Wu et al., Mol. Ther. 16(2):280-289, 2008; Gray et al., Human Gene Ther. 22:1143-1153, 2011; Choi et al., Mol. Brain 7:17, 2014), β-глобин мыши, α-глобин мыши (Orkin et al., EMBO J. 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood 71(2):313-319, 1988), коллаген человека, вирус полиомы (Batt et al., Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790, 1995), ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), сигнал полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354), гормон роста человека (hGH) (Szymanski et al., Mol. Therapy 15(7):1340-1347, 2007; Ostegaard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(8):2952-2957, 2005), синтетический polyA (Levitt et al., Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989; Yew et al., Human Gene Ther. 8(5):575-584, 1997; Ostegaard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102(8):2952-2957, 2005; Choi et al., Mol. Brain 7:17, 2014), энхансер вышестоящего poly(A) ВИЧ-1 (Schambach et al., Mol. Ther. 15(6):1167-1173, 2007), энхансер вышестоящего poly(A) аденовируса (L3) (Schambach et al., Mol. Ther. 15(6):1167-1173, 2007), энхансер вышестоящего poly(A) hTHGB (Schambach et al., Mol. Ther. 15(6):1167-1173, 2007), энхансер вышестоящего poly(A) hC2 (Schambach et al., Mol. Ther. 15(6):1167-1173, 2007), группа, состоящая из сигнальной последовательности poly(A) SV40, такой как поздняя и ранняя сигнальная последовательность poly(A) SV40 (Schek et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992; Choi et al., Mol. Brain 7:17, 2014; Schambach et al., Mol. Ther. 15 (6):1167-1173, 2007). Неограничивающим примером сигнальной последовательности poly(A) является SEQ ID NO: 68, 76 или 77.

Сигнальная последовательность poly(A) может представлять собой последовательность AATAAA. Последовательность AATAAA может быть заменена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными AATAAA, которые способны подавать сигнал полиаденилирования, включая ATTAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAA или AATAAG (см., например, WO 06/12414).

В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность poly(A) может представлять собой сайт синтетического полиаденилирования (см., например, вектор экспрессии pCl-neo компании Promega, основанный на Levitt et al., Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989). В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность poly(A) представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (AAATAAAATACGAAATG) (см., например, WO 05/073384). В некоторых вариантах осуществления, poly(A) последовательность представляет собой poly(A) последовательность гормона роста крупного рогатого скота. В некоторых таких вариантах осуществления, последовательность poly(A) bGH содержит или представляет собой последовательность SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления, вектор или конструкция по настоящему изобретению содержит последовательность polyA гормона роста животного, представленную SEQ ID NO: 108. Дополнительные примеры сигнальных последовательностей poly(A) известны в данной области техники.

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

Участок внутренней посадки рибосомы (IRES)

В некоторых вариантах осуществления, вектор, кодирующий C-конец белка отоферлина, может включать полинуклеотидный участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более чем одного полипептида из транскрипта одного гена. IRES образует сложную вторичную структуру, которая позволяет инициировать трансляцию из любого положения с мРНК, расположенной непосредственно ниже места расположения IRES (см., например, Pelletier and Sonenberg, Mol. Cell. Biol. 8(3):1103-1112, 1988).

Существует несколько последовательностей IRES, известных специалистам в данной области техники, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), риновируса человека (HRV), вируса паралича сверчков, вируса иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита A (HAV), вирус гепатита C (HCV) и полиовирус (PV). См., например, Alberts, Molecular Biology of the Cell, Garland Science, 2002; и Hellen et al., Genes Dev. 15(13):1593-612, 2001.

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

Репортерные последовательности

Любой из представленных в настоящем документе векторов может необязательно включать последовательность, кодирующую репортерный белок («репортерную последовательность»). В настоящем документе описаны неограничивающие примеры репортерных последовательностей. Дополнительные примеры репортерных последовательностей известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, репортерную последовательность можно использовать для проверки способности к тканеспецифичному таргетированию и регуляторной активности тканеспецифического промотора любого из векторов, описанных в настоящем документе.

NTF3

Любой из представленных в настоящем документе векторов может необязательно включать последовательность, кодирующую белок нейротрофин-3 (NTF3). В некоторых вариантах осуществления, белок NTF3 может иметь последовательность на, по меньшей мере, 70% идентичную, на, по меньшей мере, 72% идентичную, на, по меньшей мере, 74% идентичную, на, по меньшей мере, 76% идентичную, на, по меньшей мере, 78% идентичную, на, по меньшей мере, 80% идентичную, на, по меньшей мере, 82% идентичную, на, по меньшей мере, 84% идентичную, на, по меньшей мере, 86% идентичную, на, по меньшей мере, 88% идентичную, на, по меньшей мере, 90% идентичную, на, по меньшей мере, 92% идентичную, на, по меньшей мере, 94% идентичную, на, по меньшей мере, 96% идентичную, на, по меньшей мере, 98% идентичную, на, по меньшей мере, 99% идентичную или на 100% идентичную SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления, белок NTF3 может включать последовательность, идентичную SEQ ID NO: 78, за исключением того, что она включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен и/или делеций.

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

Специалист в данной области техники поймет, что мутация аминокислот, которые не являются консервативными между одним и тем же белком разных видов, с меньшей вероятностью будет влиять на функцию белка, и поэтому эти аминокислоты следует выбирать для мутации. Аминокислоты, консервативные в одном и том же белке разных видов, не должны подвергаться мутациям, поскольку эти мутации с большей вероятностью приведут к изменению функции белка. Неограничивающие примеры нейтрофина-3 других видов млекопитающих показаны ниже.

Нейротрофин-3 коровы (SEQ ID NO: 81)

Нейротрофин-3 крысы (SEQ ID NO: 82)

Нейротрофин-3 свиньи (SEQ ID NO: 83)

Фланкирующие области нетранслируемые области (UTR)

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

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5’ UTR начинается с сайта начала транскрипции и продолжается до инициирующего кодона, но не включает инициирующий кодон. 3'UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Появляется все больше данных о регуляторной роли UTR в отношении стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные признаки UTR могут быть включены в любой из векторов, композиций, наборов или способов, описанных в настоящем документе, для повышения стабильности белка отоферлина.

Последовательности Козака

Природные 5’ UTR включают последовательность, которая играет роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры, такие как последовательности Козака, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козака имеют консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG, где R представляет собой пурин (A или G) на три основания выше инициирующего кодона (AUG), за которым следует еще один «G». Также известно, что 5’ UTR, например, образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

Например, в некоторых вариантах осуществления, 5’ UTR включен в любой из описанных в настоящем документе векторов. Неограничивающие примеры 5’ UTR, включающие таковые из следующих генов: альбумина, сывороточного амилоида A, аполипопротеина A/B/E, трансферрина, альфа-фетопротеина, эритропоэтина и фактора VIII, можно использовать для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты., такой как мРНК.

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

Известно, что в 3’ UTR встроены удлинения аденозинов и уридинов. Эти сигнатуры, богатые AU, особенно распространены в генах с высокой скоростью оборота. На основании особенностей их последовательностей и функциональных свойств, элементы, богатые AU (ARE), можно разделить на три класса (Chen et al., Mol. Cell. Biol. 15:5777-5788, 1995; Chen et al., Mol. Cell Biol. 15:2010-2018, 1995): ARE класса I содержат несколько рассредоточенных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. Например, мРНК c-Myc и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II обладают двумя или несколькими перекрывающимися нонамерами UUAUUUA(U/A) (U/A). мРНК GM-CSF и TNF-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III определены менее четко. Эти области, богатые U, не содержат мотив AUUUA. Двумя хорошо изученными примерами этого класса являются c-Jun и мРНК миогенина.

Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мессенджер, тогда как члены семейства ELAV, в первую очередь HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование специфических сайтов связывания HuR в 3'UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, к стабилизации сообщения in vivo.

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

Последовательности донора сплайсинга и акцептора сплайсинга

В других вариантах осуществления, последовательности, отличные от UTR, могут быть включены в 5’ или 3’ UTR. В некоторых вариантах осуществления, интроны или части последовательностей интронов могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любых векторах, композициях, наборах и способах, представленных в настоящем документе. Включение интронных последовательностей может увеличить продуцирование белка, а также уровни мРНК. Интрон может быть интроном из гена отоферлина или может быть интроном из гетерологичного гена, например, интроном гибридного аденовируса/ иммуноглобулина мыши (Yew et al., Human Gene Ter. 8(5):575-584, 1997), интроном SV40 (Ostedgaard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(8):2952-2957, 2005), интроном MVM (Wu et al., Mol. Ther. 16(2):280-289, 2008), усеченным интроном 1 фактора IX (Wu et al., Mol. Ther. 16(2):280-289, 2008; Kurachi et al., J. Biol. Chem. 270(10):5276-5281, 1995), интрона химерного донора сплайсинга J-глобулина/акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина (Wu et al., Mol. Ther. 16(2):280-289, 2008; Choi et al., Mol. Brain 7:17, 2014), интрона позднего донора сплайсинга/акцептора сплайсинга SV40 (19S/16S) (Yew et al., Human Gene Ther. 8(5):575-584, 1997), гибридного донора сплайсинга аденовируса/акцептора сплайсинга IgG (Choi et al., Mol. Brain 7:17, 1991; Huang and Gorman, Mol. Cell Biol. 10(4):1805-1810, 1990).

Неограничивающими примерами последовательностей донора сплайсинга и акцептора сплайсинга являются SEQ ID NO: 64 и 65, соответственно; SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно; и SEQ ID NO: 74 и 75, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, последовательность донора сплайсинга имеет последовательность SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления, вектор конструкции по настоящему изобретению содержит последовательность донора сплайсинга SEQ ID NO: 102. В некоторых таких вариантах осуществления, вектор или конструкция, содержащая последовательность донора сплайсинга (например, SEQ ID NO: 102), также содержит 5' часть гена OTOF или кДНК OTOF (например, SEQ ID NO: 101) выше последовательности донора сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, последовательность акцептора сплайсинга имеет последовательность SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления, вектор или конструкция по настоящему изобретению содержит последовательность акцептора сплайсинга SEQ ID NO: 106. В некоторых таких вариантах осуществления, вектор или конструкция, содержащая последовательность акцептора сплайсинга (например, SEQ ID NO: 106), также содержит 3' часть гена OTOF или кДНК OTOF (например, SEQ ID NO: 107) ниже последовательности акцептора сплайсинга.

Домены дестабилизации

Любой из представленных в настоящем документе векторов может необязательно включать последовательность, кодирующую домен дестабилизации («последовательность домена дестабилизации»). Домен дестабилизации представляет собой аминокислотную последовательность, которая уменьшает время полужизни in vivo или in vitro белка, который включает домен дестабилизации, например, по сравнению с тем же белком, в котором отсутствует домен стабилизации. Например, домен дестабилизации может привести к таргетированию белка, который включает домен дестабилизации, для протеосомной деградации. Неограничивающие примеры доменов дестабилизации включают дестабилизирующий домен дигидрофолатредуктазы E. coli (DHFR) (Iwamoto et al. (2010) Chem. Biol. 17(9): 981-998) и белок, связывающий FK-506 (FKBP) (Wenlin et al.

(2015) PLoS One 10(12): e0145783). SEQ ID NO: 53 представляет собой пример аминокислотной последовательности домена дестабилизации DHFR. Дополнительные примеры доменов дестабилизации известны в данной области техники.

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

Рекомбиногенные последовательности

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько векторов или конструкций по настоящему изобретению содержат одну или несколько рекомбиногенных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, рекомбиногенная последовательность представляет собой или содержит часть последовательности гена. В некоторых вариантах осуществления, рекомбиногенная последовательность получена из гена щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления, рекомбиногенная последовательность получена из фага F1. В некоторых таких вариантах осуществления, рекомбиногенная последовательность представляет собой последовательность AK, полученную из фага F1. В некоторых вариантах осуществления, такой рекомбиногенной последовательностью AK является SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления двойной векторной системы по настоящему описанию, каждый из двух векторов содержит рекомбиногенную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению содержит первый вектор со последовательностью донора сплайсинга (например, SEQ ID NO: 102), расположенной ниже 5' части гена OTOF или кДНК OTOF (например, SEQ ID NO: 101) и выше рекомбиногенной последовательности AK (например, SEQ ID NO: 103), и второй вектор с последовательностью акцептора сплайсинга (например, SEQ ID NO: 106), расположенной выше 3' части гена OTOF или кДНК OTOF (например, SEQ ID NO: 107) и ниже рекомбиногенной последовательности AK (например, SEQ ID NO: 103).

Дополнительные последовательности

Любой из представленных в настоящем документе векторов может необязательно включать дополнительные нуклеотидные последовательности («спейсерную последовательность») для оптимизации общего количества пар оснований в векторе. Например, для оптимизации упаковки каждый вектор может содержать от примерно 4000 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, например, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4250 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4200 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4150 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4100 пар оснований, от примерно 4000 пар оснований до примерно 4,050 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4250 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4200 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4150 пар оснований, от примерно 4050 пар оснований до примерно 4100 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4250 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4200 пар оснований, от примерно 4100 пар оснований до примерно 4150 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4250 пар оснований, от примерно 4150 пар оснований до примерно 4200 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4200 пар оснований до примерно 4250 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4250 пар оснований до примерно 4300 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4300 пар оснований до примерно 4350 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4350 пар оснований до примерно 4400 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4400 пар оснований до примерно 4450 пар оснований, от примерно 4450 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4450 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4450 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4450 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4450 пар оснований до примерно 4500 пар оснований, от примерно 4500 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4500 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4500 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4500 пар оснований до примерно 4550 пар оснований, от примерно 4550 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4550 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, от примерно 4550 пар оснований до примерно 4600 пар оснований, от примерно 4600 пар оснований до примерно 4700 пар оснований, от примерно 4600 пар оснований до примерно 4650 пар оснований, or от примерно 4650 пар оснований до примерно 4700 пар оснований (включительно).

Спейсерная последовательность может представлять собой любую нуклеотидную последовательность, например, длиной до 1000 т.н., которая может быть включена в любой из векторов, описанных в настоящем документе, которая не транскрибируется и не выполняет регуляторную функцию для достижения желаемого размера вектора (например, размера вектора от примерно 4 т.н. до примерно 5 т.н. или любого из приведенных в настоящем документе размеров вектора). Например, спейсерная последовательность может представлять собой любую нуклеотидную последовательность размером от примерно 100 т.н. до примерно 1000 т.н. (например, от примерно 100 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 100 т.н. до примерно 100 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 200 т.н. до примерно 300 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 300 т.н. до примерно 400 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 400 т.н. до примерно 500 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 500 т.н. до примерно 600 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 600 т.н. до примерно 700 т.н., от примерно 700 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 700 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 700 т.н. до примерно 800 т.н., от примерно 800 т.н. до примерно 1000 т.н., от примерно 800 т.н. до примерно 900 т.н., от примерно 900 т.н. до примерно 1000 т.н., примерно 100 т.н., примерно 150 т.н., примерно 200 т.н., примерно 250 т.н., примерно 300 т.н., примерно 350 т.н., примерно 400 т.н., примерно 450 т.н., примерно 500 т.н., примерно 550 т.н., примерно 600 т.н., примерно 650 т.н., примерно 700 т.н., примерно 750 т.н., примерно 800 т.н., примерно 850 т.н., примерно 900 т.н., примерно 950 т.н. или примерно 1000 т.н. SEQ ID NO. 54-58, 90 и 91 представляют собой типовые буферные последовательности фактора VIII человека, которые можно использовать в любом из описанных в настоящем документе векторов. Дополнительные спейсерные последовательности известны в данной области техники. Примеры векторов, которые включают спейсерные последовательности, показаны на фигурах 21-31, 36, 37, 59-63 и 66.

Двойные векторные композиции AAV

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим один или несколько векторов для доставки терапевтического гена, например, всего терапевтического гена или его функциональной части, нуждающемуся в этом субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления, ген отоферлина слишком велик, чтобы его можно было упаковать в один рекомбинантный вектор, например рекомбинантный вектор AAV. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления для доставки терапевтического гена, например всего терапевтического гена, субъекту, нуждающемуся в этом, используют два или несколько векторов. Например, в некоторых вариантах осуществления используется двойная векторная система, где каждый из двух векторов содержит часть гена отоферлина человека, и при доставке in vivo конструкции объединяются для создания полинуклеотида, который кодирует полноразмерный, функциональный, белок отоферлин. В некоторых вариантах осуществления, используется одна или несколько стратегий, например, (i) стратегия конкатемеризации-транс-сплайсинга, (ii) гибридная стратегия интронно-гомологичной рекомбинации-транс-сплайсинга и (iii) стратегия экзонной гомологичной рекомбинации, как резюмировано Pryadkina et al. Meth Clin Devel 2015, 2:15009

Клетки млекопитающих

Также в настоящем документе предложена клетка (например, клетка млекопитающего), которая включает любую из нуклеиновых кислот, векторы (например, по меньшей мере, два разных вектора, описанных в настоящем документе) или композиции, описанные в настоящем документе. Практикующим специалистам в данной области техники понятно, что нуклеиновые кислоты и векторы, описанные в настоящем документе, могут быть введены в любую клетку млекопитающего. В настоящем документе описаны неограничивающие примеры векторов и способов введения векторов в клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку человека, клетку мыши, клетку свиньи, клетку кролика, клетку собаки, клетку кошки, клетку крысы, клетку овцы, клетку кошки, клетку лошади или клетку примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой специализированную клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки или наружную волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка, представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки.

В некоторых вариантах осуществления, клетка млекопитающего находится in vitro. В некоторых вариантах осуществления, клетка млекопитающего присутствует у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетку млекопитающего получают от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, клетка млекопитающего представляет собой аутологичную клетку, полученную от субъекта и/или культивируемую ex vivo.

Способы использования

Способ введения в улитку

Также в настоящем документе предусмотрен способ введения в улитку млекопитающего (например, человека) терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. Также предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего (например, человека), которые включают введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе. Также предложены способы лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта (например, у человека), у которого выявлен дефектный ген отоферлина, где способы включают введение терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе, в улитку субъекта. В некоторых примерах, способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать введение нейротрофического фактора в улитку субъекта (например, по существу в то же время, или до, или после того, как субъекту вводят любую из композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых примерах, способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать введение субъекту кохлеарного имплантата (например, по существу в то же время, или до, или после того, как субъекту вводят любую из композиций, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, млекопитающее ранее было идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина (например, ген отоферлина, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности белка отоферлина, кодируемого геном). Некоторые варианты осуществления любого из этих способов дополнительно включают, перед стадией введения или введения определение наличия у субъекта дефектного гена отоферлина. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут дополнительно включать обнаружение мутации в гене отоферлина у субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из способов могут дополнительно включать идентификацию или диагностику субъекта с бессимптомной нейросенсорной потеря слуха.

В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов, две или несколько доз любой из композиций, описанных в настоящем документе вводят или вводят в улитку млекопитающего или субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение или введение первой дозы композиции в улитку млекопитающего или субъекта, оценку слуховой функции млекопитающего или субъекта после введения или введения первой дозы, и введение дополнительной дозу композиции в улитку млекопитающего или субъекта, у которого обнаружено, что функция слуха не находится в нормальном диапазоне (например, как определено с использованием любого теста на слух, известного в данной области техники).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композиция может быть составлена для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить посредством внутрикохлеарного введения или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композиции вводят с помощью медицинского устройства (например, любого из типовых медицинских устройств, описанных в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления, внутрикохлеарное введение можно осуществлять с использованием любого из способов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Например, композицию можно вводить или вводить в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с помощью визуализации с помощью 2,5-мм жесткого эндоскопа 0 градусов очищают наружный слуховой проход и круглым ножом резко очерчивают приблизительно 5 мм тимпаномеатальный лоскут. Затем тимпаномеатальный лоскут приподнимают и вводят в среднее ухо сзади. Нерв барабанной струны идентифицируют и делят, и с помощью кюретки удаляют скутальную кость, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенной или введенной композиции можно использовать хирургический лазер для создания небольшой 2 мм фенестрации в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии композиции через мембрану круглого окна. Затем микроинфузионное устройство загружают и вводят в операционное поле. Устройство подводят к круглому окну, а кончик помещают в костный выступ круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроиглы(микроигл) через мембрану. Педаль включают, чтобы обеспечить размеренное, устойчивое введение композиции. Затем устройство извлекают, и круглое окно и опорную пластину стремени герметизируют пластырем из гелевой пены.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание описывает подход к доставке, который использует минимально инвазивную, хорошо принятую хирургическую технику для доступа к среднему уху и/или внутреннему уху через наружный слуховой проход. Процедура включает открытие одного из физических барьеров между средним и внутренним ухом в овальном окне и последующее использование устройства, описанного в настоящем документе, например, как показано на ФИГ. 82-87 (или микрокатетера), для доставки композиции, описанной в настоящем документе, с регулируемой скоростью потока и в фиксированном объеме через мембрану круглого окна.

В некоторых вариантах осуществления, хирургические процедуры для млекопитающих (например, грызунов (например, мышей, крыс, хомяков или кроликов), приматов (например, NHP (например, макак, шимпанзе, обезьян или человекообразных обезьян) или людей) могут включать вентиляцию для увеличения скоростей трансдукции вектора AAV по длине улитки. В некоторых вариантах осуществления, отсутствие вентиляции во время операции может привести к более низкой скорости трансдукции клеток улитки вектором AAV по сравнению со скоростью трансдукции клеток улитки вектором AAV после операций, выполненных с вентиляцией. В некоторых вариантах осуществления, вентиляция способствует скорости трансдукции примерно 75-100% IHC через улитку. В некоторых вариантах осуществления, вентиляция обеспечивает скорость трансдукции IHC примерно 50-70%, примерно 60-80%, примерно 70-90% или примерно 80-100% на верхушке улитки.

Устройство доставки, описанное в настоящем документе, может быть помещено в стерильное поле операционной, и конец трубки может быть удален из стерильного поля и соединен со шприцем, в который загружена композиция, описанная в настоящем документе (например, один или несколько AAV векторов) и установлены в насосе. После соответствующей подготовки системы для удаления воздуха, можно провести иглу через среднее ухо под визуальным контролем (хирургический микроскоп, эндоскоп и/или камера на дистальном конце). Иглу (или микроиглу) можно использовать для прокола RWM. Игла может быть введена до тех пор, пока стопор не коснется RWM. Затем устройство можно удерживать в этом положении, в то время как описанная в настоящем документе композиция доставляется с регулируемой скоростью потока во внутреннее ухо в течение выбранного периода времени. В некоторых вариантах осуществления, скорость потока (или скорость инфузии) может включать скорость примерно 30 мкл/мин, или от примерно 25 мкл/мин до примерно 35 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 40 мкл/мин или от примерно 20 мкл/мин до примерно 70 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 90 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления, скорость потока составляет примерно 20 мкл/мин, примерно 30 мкл/мин, примерно 40 мкл/мин, примерно 50 мкл/мин, примерно 60 мкл/мин, примерно 70 мкл/мин, примерно 80 мкл/мин, примерно 90 мкл/мин или примерно 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления, выбранная продолжительность времени (то есть время, в течение которого протекает композиция, описанная в настоящем документе) может составлять примерно 3 минуты, или от примерно 2,5 минут до примерно 3,5 минут, или от примерно 2 минут до примерно 4 минут, или от примерно 1,5 минут до примерно 4,5 минут, или от примерно 1 минуты до примерно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, общий объем описанной в настоящем документе композиции, которая поступает во внутреннее ухо, может составлять примерно 0,09 мл, или от примерно 0,08 мл до примерно 0,10 мл, или от примерно 0,07 мл до примерно 0,11 мл. В некоторых вариантах осуществления, общий объем описанный в настоящем документе композиции составляет от примерно 40% до примерно 50% объема внутреннего уха.

После завершения доставки, устройство может быть удалено. В некоторых вариантах осуществления, устройство, описанное в настоящем документе, может быть сконфигурировано как одноразовое изделие для одноразового использования. В других вариантах осуществления, устройство, описанное в настоящем документе, может быть сконфигурировано как многоразовое стерилизуемое изделие, например, со сменным и/или стерилизуемым узлом иглы. Одноразовые устройства можно надлежащим образом выбросить (например, в контейнер для биологически опасных острых предметов) после завершения введения.

В некоторых вариантах осуществления, композиция, описанная в настоящем документе, содержит один или несколько векторов AAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одного вектора AAV, все векторы

AAV отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит кодирующую область OTOF, например, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит частицу rAAV, содержащую вектор AAV, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, частица rAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

Субъекты

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, субъект или млекопитающее представляет собой грызуна, примата, отличного от человека, или человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, субъект или млекопитающее является взрослым, подростком, подростком, ребенком, малышом, младенцем или новорожденным. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, возраст субъекта или млекопитающего составляет 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110 или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

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

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта или млекопитающего имеется или возможен риск развития внесиндромной нейросенсорной потери слуха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта или млекопитающего ранее было идентифицировано наличие мутации в гене отоферлина. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, субъект или млекопитающее имеет любую из мутаций в гене отоферлина, которые описаны в настоящем документе или известны в данной области техники как связанные с бессимптомной нейросенсорной потеря слуха.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, субъект или млекопитающее было идентифицировано как носитель мутации в гене отоферлина (например, с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта или человека была идентифицирована мутация в гене отоферлина, и у него была диагностирована бессимптомная нейросенсорная потеря слуха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта или человека была идентифицирована бессимптомная нейросенсорная потеря слуха.

В некоторых вариантах осуществления, успешное лечение бессимптомной нейросенсорной потери слуха можно определить у субъекта с помощью любого из обычных функциональных тестов слуха, известных в данной области техники. Неограничивающими примерами функциональных тестов слуха являются различные типы аудиометрических анализов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тест среднего уха, слуховой ответ ствола мозга и отоакустическая эмиссия).

Увеличение экспрессии активного отоферлина

Также в настоящем документе предложены способы увеличения экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) в клетке млекопитающего, которые включают введение любой из композиций, описанных в настоящем документе, в клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих способов, клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления этих способов, клетка млекопитающего представляет собой клетку человека (например, внутреннюю волосковую клетку улитки человека). В некоторых вариантах осуществления этих способов, клетка млекопитающего находится in vitro. В некоторых вариантах осуществления этих способов, клетка млекопитающего находится в организме млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих способов, клетку млекопитающего первоначально получают от млекопитающего и/или культивируют ex vivo. В некоторых вариантах осуществления, ранее было определено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

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

В некоторых вариантах осуществления, увеличение экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина), как описано в настоящем документе, происходит, например, по сравнению с контролем или уровнем экспрессии активного белка отоферлина (например, полноразмерного белка отоферлина) перед введением вектора(ов).

Способы обнаружения отоферлина

Способы обнаружения экспрессии и/или активности отоферлина известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, уровень экспрессии белка отоферлина может быть определен непосредственно (например, обнаружение белка отоферлина или определение мРНК отоферлина). Неограничивающие примеры способов, которые можно использовать для непосредственного определения экспрессии и/или активности отоферлина, включают: ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия белка отоферлина может быть обнаружена косвенно (например, с помощью тестов функционального слуха).

Композиции

Помимо прочего, настоящее изобретение предлагает композиции. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит конструкцию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит одну или несколько конструкций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит множество конструкций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции, конструкция являются разными.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит вектор AAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит один или несколько векторов AAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит множество векторов AAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одного вектора AAV, все векторы AAV отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит кодирующую область OTOF, например, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит одну или несколько частиц рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления, частица rAAV содержит рекомбинантный вектор AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления, частица rAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой или содержит фармацевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления, композиция, описанная в настоящем документе, находится в растворе.

Дозировка и объем введения

В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию, например, один или несколько векторов AAV, описанных в настоящем документе, вводят в виде разовой дозы или в виде множества доз.

В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах осуществления, композиция, описанная в настоящем документе, вводится в виде множества доз, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз.

В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию (например, композицию, содержащую один или несколько векторов AAV, описанных в настоящем документе) вводят в объеме примерно 0,01 мл, примерно 0,02 мл, примерно 0,03 мл, примерно 0,04 мл, примерно 0,05 мл, примерно 0,06 мл, примерно 0,07 мл, примерно 0,08 мл, примерно 0,09 мл, примерно 1,00 мл, примерно 1,10 мл, примерно 1,20 мл, примерно 1,30 мл, примерно 1,40 мл, примерно 1,50 мл, примерно 1,60 мл, примерно 1,70 мл, примерно 1,80 мл, примерно 1,90 мл или примерно 2,00 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,01 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,02 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,03 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,04 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,05 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,06 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,07 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,08 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 0,09 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,00 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,10 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,20 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,30 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,40 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,50 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,60 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,70 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,80 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 1,90 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию вводят в объеме примерно 2,00 мл.

В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию (например, композицию, содержащую один или несколько векторов AAV, описанных в настоящем документе) вводят в объеме от примерно 0,01 до 2,00 мл, от примерно 0,02 до 1,90 мл, от примерно 0,03 до 1,8 мл, примерно 0,04 мл до 1,70 мл, от примерно 0,05 до 1,60 мл, от примерно 0,06 до 1,50 мл, от примерно 0,06 до 1,40 мл, от примерно 0,07 до 1,30 мл, от примерно 0,08 до 1,20 мл или от примерно 0,09 до 1,10 мл. В некоторых вариантах осуществления, описанную в настоящем документе композицию (например, композицию, содержащую один или несколько векторов AAV, описанных в настоящем документе) вводят в объеме от примерно 0,01 до 2,00 мл, от примерно 0,02 до 2,00 мл, от примерно 0,03 до 2,00 мл, от примерно 0,04 до 2,00 мл, от примерно 0,05 до 2,00 мл, от примерно 0,06 до 2,00 мл, от примерно 0,07 до 2,00 мл, от примерно 0,08 до 2,00 мл, от примерно 0,09 до 2,00 мл, от примерно 0,01 до 1,90 мл, от примерно 0,01 до 1,80 мл, от примерно 0,01 до 1,70 мл, от примерно 0,01 до 1,60 мл, от примерно 0,01 до 1,50 мл, от примерно 0,01 до 1,40 мл, от примерно 0,01 до 1,30 мл, от примерно 0,01 до 1,20 мл, от примерно 0,01 до 1,10 мл, от примерно 0,01 до 1,00 мл, от примерно 0,01 до 0,09 мл.

Фармацевтические композиции и наборы

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать нуклеиновую кислоту, например, один или несколько векторов AAV, как описано в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может содержать один или несколько векторов AAV, например, одну или несколько конструкций AAV, инкапсулированных одним или несколькими капсидами серотипа AAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и подобные; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны; маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению, в одном аспекте, составлены для внутрикохлеарного введения. Композиции по настоящему изобретению, в одном аспекте, составлены для внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции составлены для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат полимерные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции составляют так, чтобы они содержали мини-кольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат синтетический раствор перилимфы. Типовой раствор синтетической перилимфы содержит 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ $CaCl_2$; 1-10 мМ глюкозы; и 2-50 мМ HEPES с pH от примерно 6 до примерно 9.

В некоторых вариантах осуществления, любая из композиций, описанных в настоящем документе, может дополнительно включать один или несколько агентов, которые способствуют проникновению нуклеиновой кислоты или любого из векторов, описанных в настоящем документе, в клетку млекопитающего (например, липосому или катионный липид). В некоторых вариантах осуществления любой из векторов, описанных в настоящем документе, может быть составлен с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из описанных в настоящем документе композиций, могут включать, но не ограничены ими, DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif.), составы от Mirus Bio (Madison, Wis.) и Roche Madison (Madison, Wis.), полимерные составы PhaseRX, такие как, без ограничения, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Seattle, Wash.), DMRI/DOPE, полоксамер, адъювант VAXFECTIN® от Vical (San Diego, Calif.), хитозан, циклодекстрин от Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif.), дендримеры и полимеры поли(молочно-гликолевой кислоты) (PLGA), полимеры RONDEL™ (доставка наночастиц РНКи/олигонуклеотидов) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, Calif.) и со-блокполимеры, чувствительные к pH, такие как, но не ограничиваясь ими, производимые PhaseRX (Seattle, Wash.). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность доставки олигонуклеотидов in vivo в клетку млекопитающего (см., например, deFougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5715-5721, 2007). Любая из описанных в настоящем документе композиций может быть, например, фармацевтической композицией.

В некоторых вариантах осуществления, композиция включает фармацевтически приемлемый носитель (например, забуференный фосфатом солевой раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). После составления растворы будут вводиться способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в различных дозированных формах, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и подобные.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты и подобные, совместимые с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в любую из описанных в настоящем документе композиций.

В некоторых вариантах осуществления, разовая доза любой из композиций, описанных в настоящем документе может включать общее суммарное количество, по меньшей мере, двух различных векторов, по меньшей мере, 1 нг, по меньшей мере, 2 нг, по меньшей мере, 4 нг, примерно 6 нг, примерно 8 нг, по меньшей мере, 10 нг, по меньшей мере, 20 нг, по меньшей мере, 30 нг, по меньшей мере, 40 нг, по меньшей мере, 50 нг, по меньшей мере, 60 нг, по меньшей мере, 70 нг, по меньшей мере, 80 нг, по меньшей мере, 90 нг, по меньшей мере, 100 нг, по меньшей мере, 200 нг, по меньшей мере, 300 нг, по меньшей мере, 400 нг, по меньшей мере, 500 нг, по меньшей мере, 1 мкг, по меньшей мере, 2 мкг, по меньшей мере, 4 мкг, по меньшей мере, 6 мкг, по меньшей мере, 8 мкг, по меньшей мере, 10 мкг, по меньшей мере, 12 мкг, по меньшей мере, 14 мкг, по меньшей мере, 16 мкг, по меньшей мере, 18 мкг, по меньшей мере, 20 мкг, по меньшей мере, 22 мкг, по меньшей мере, 24 мкг, по меньшей мере, 26 мкг, по меньшей мере, 28 мкг, по меньшей мере, 30 мкг по меньшей мере, 32 мкг, по меньшей мере, 34 мкг, по меньшей мере, 36 мкг, по меньшей мере, 38 мкг, по меньшей мере, 40 мкг, по меньшей мере, 42 мкг, по меньшей мере, 44 мкг, по меньшей мере, 46 мкг, по меньшей мере, 48 мкг, по меньшей мере, 50 мкг, по меньшей мере, 52 мкг, по меньшей мере, 54 мкг, по меньшей мере, 56 мкг, по меньшей мере, 58 мкг, по меньшей мере, 60 мкг, по меньшей мере, 62 мкг, по меньшей мере, 64 мкг, по меньшей мере, 66 мкг, по меньшей мере, 68 мкг, по меньшей мере, 70 мкг, по меньшей мере, 72 мкг, по меньшей мере, 74 мкг, по меньшей мере, 76 мкг, по меньшей мере, 78 мкг, по меньшей мере, 80 мкг, по меньшей мере, 82 мкг, по меньшей мере, 84 мкг, по меньшей мере, 86 мкг, по меньшей мере, 88 мкг, по меньшей мере, 90 мкг, по меньшей мере, 92 мкг, по меньшей мере, 94 мкг, по меньшей мере, 96 мкг, по меньшей мере, 98 мкг, по меньшей мере, 100 мкг, по меньшей мере, 102 мкг, по меньшей мере, 104 мкг, по меньшей мере, 106 мкг, по меньшей мере, 108 мкг, по меньшей мере, 110 мкг, по меньшей мере, 112 мкг, по меньшей мере, 114 мкг, по меньшей мере, 116 мкг, по меньшей мере, 118 мкг, по меньшей мере, 120 мкг, по меньшей мере, 122 мкг, по меньшей мере, 124 мкг, по меньшей мере, 126 мкг, по меньшей мере, 128 мкг, по меньшей мере, 130 мкг по меньшей мере, 132 мкг, по меньшей мере, 134 мкг, по меньшей мере, 136 мкг, по меньшей мере, 138 мкг, по меньшей мере, 140 мкг, по меньшей мере, 142 мкг, по меньшей мере, 144 мкг, по меньшей мере, 146 мкг, по меньшей мере, 148 мкг, по меньшей мере, 150 мкг, по меньшей мере, 152 мкг, по меньшей мере, 154 мкг, по меньшей мере, 156 мкг, по меньшей мере, 158 мкг, по меньшей мере, 160 мкг, по меньшей мере, 162 мкг, по меньшей мере, 164 мкг, по меньшей мере, 166 мкг, по меньшей мере, 168 мкг, по меньшей мере, 170 мкг, по меньшей мере, 172 мкг, по меньшей мере, 174 мкг, по меньшей мере, 176 мкг, по меньшей мере, 178 мкг, по меньшей мере, 180 мкг, по меньшей мере, 182 мкг, по меньшей мере, 184 мкг, по меньшей мере, 186 мкг, по меньшей мере, 188 мкг, по меньшей мере, 190 мкг, по меньшей мере, 192 мкг, по меньшей мере, 194 мкг, по меньшей мере, 196 мкг, по меньшей мере, 198 мкг, or по меньшей мере, 200 мкг, например, в буферном растворе.

Композиции, предложенные в настоящем документе, могут быть, например, составлены таким образом, чтобы быть совместимыми с их предполагаемым путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например, внутрикохлеарное введение).

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции включают липидные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции включают полимерные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции составляют так, чтобы они содержали мини-кольцевую ДНК. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат ДНК CELiD. В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции содержат синтетический раствор перилимфы. Пример синтетического раствора перилимфы включает 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ $CaCl_2$; 1-10 мМ глюкозы; 2-50 мМ HEPES, имеющий pH от примерно 6 до примерно 9.

Также предложены наборы, включающие любую из описанных в настоящем документе композиций. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать твердую композицию (например, лиофилизированную композицию, включающую, по меньшей мере, два различных вектора, описанных в настоящем документе) и жидкость для солюбилизации лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать предварительно заполненный шприц, содержащий любую из описанных в настоящем документе композиций.

В некоторых вариантах осуществления, набор включает ампулу, содержащую любую из описанных в настоящем документе композиций (например, составленную в виде водной композиции, например, водную фармацевтическую композицию).

В некоторых вариантах осуществления, набор может включать инструкции по проведению любого из способов, описанных в настоящем документе.

Пути введения

Фармацевтические формы, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и текучей до такой степени, что существует возможность ее легкого шприцевания. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и подобные), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предупредить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросал и подобных. Во многих случаях, предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено за счет использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Для введения водного раствора для инъекций, например, раствор может быть соответствующим образом забуферен, если это необходимо, и жидкий разбавитель сначала делается изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, специалистам в данной области техники известна стерильная водная среда, которую можно использовать. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо введена в предполагаемое место инфузии (см., например, «“Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, страницы 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно произойдет в зависимости от состояния хозяина. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет подходящую дозу для конкретного хозяина.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активного rAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными в настоящем документе, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются методы вакуумной сушки и сушки замораживанием, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно профильтрованного в стерильных условиях.

Композиции rAAV, описанные в настоящем документе, также могут быть составлены в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные из свободных аминогрупп белка) и которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и подобные. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и подобные. После составления, растворы будут вводиться способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легко вводятся в различных дозированных формах, таких как растворы для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и подобные.

Используемый в настоящем документе, термин «носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и подобные. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают аллергической или подобной неблагоприятной реакции при введении хозяину.

Средства доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и подобные, могут быть использованы для введения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, трансгены, доставляемые вектором rAAV, могут быть составлены для доставки либо инкапсулированными в липидные частицы, липосомы, везикулы, наносферы, либо в наночастице и подобных.

Такие составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых составов нуклеиновых кислот или конструкций rAAV, описанных в настоящем документе. Составление и применение липосом, как правило, известно специалистам в данной области техники. Недавно были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью сыворотки и периодами полураспада (патент США № 5,741,516). Кроме того, различные способы липосомных и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США №№ 5,567,434, 5,552,157, 5,565,213, 5,738,868 и 5,795,587).

Липосомы были успешно использованы с рядом типов клеток, которые обычно устойчивы к трансфекции с помощью других процедур. Кроме того, липосомы свободны от ограничений длины ДНК, типовых для систем доставки на основе вирусов. Липосомы эффективно использовались для введения генов, лекарственных средств, радиотерапевтических агентов, вирусов, факторов транскрипции и аллостерических эффекторов в различные культивируемые клеточные линии и животных. Кроме того, было завершено несколько успешных клинических испытаний по изучению эффективности доставки лекарств с помощью липосом.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют мультиламеллярные концентрические двухслойные везикулы (также называемые мультиламеллярными везикулами (MLV). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 Тм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию малых однослойных везикул (SUV) диаметром в диапазоне от 200 до 500 ANG, содержащих водный раствор в ядре.

Альтернативно, можно использовать составы нанокапсул rAAV. Нанокапсулы обычно могут улавливать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов из-за внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультратонкие частицы (размером примерно 0,1 Тм) должны быть сконструированы с использованием полимеров, способных разлагаться in vivo. Предполагается использование биоразлагаемых полиалкилцианоакрилатных наночастиц, отвечающих этим требованиям.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы также рассматриваются как альтернативные способы доставки композиций rAAV хозяину. Сонофорез (т.е. ультразвук) использовался и описан в патенте США No. № 5,656,016 в качестве устройства для повышения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в кровеносную систему и через нее. Другими рассматриваемыми альтернативами доставки лекарственных средств являются внутрикостная инъекция (патент США № 5,779,708), устройства с микрочипами (патент США № 5,797,898), офтальмологические составы (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (патенты США № 5,770,219 и 5,783,208) и доставку, управляемую при обратной связи (патент США № 5,697,899).

Введение рассматриваемых композиций можно осуществлять любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, пероральный прием, переливание, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту трансартериально, подкожно, внутрикожно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте, композиции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению вводят субъекту посредством внутрикожной или подкожной инъекции. В одном аспекте, нуклеиновые композиции по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции.

Устройства и хирургические способы

В настоящем документе предложены технологии (например, системы, способы, устройства и т. д.), которые можно использовать в некоторых вариантах осуществления для лечения глухоты и других заболеваний, нарушений и состояний, связанных со слухом. Примеры таких технологий также включены, например, в WO 2017223193 и WO 2019084145, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает терапевтические системы доставки для лечения глухоты и других заболеваний, нарушений и состояний, связанных со слухом. В одном аспекте, предложены терапевтические системы доставки, которые включают i) медицинское устройство, способное создавать один или несколько разрезов в мембране круглого окна внутреннего уха человека, нуждающегося в этом, и ii) эффективную дозу терапевтической композиции, содержащей один или несколько векторов аденоассоциированного вируса (AAV), где один или несколько векторов AAV способны образовывать полноразмерную матричную РНК слухового полипептида в клетке-мишени внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления средств для выполнения хирургического способа, способ включает стадии: внутрикохлеарного введения субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы терапевтической композиции по настоящему изобретению, где терапевтическую композицию можно вводить с помощью медицинского устройства, которое содержит: а) средство для создания одного или нескольких разрезов в мембране круглого окна; и b) эффективную дозу терапевтической композиции.

В настоящем документе предложены хирургические способы лечения потери слуха. В одном аспекте, способы включают стадии: проведения в улитке человека первого разреза в точке первого разреза; и внутрикохлеарное введение эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой из композиций, описанных в настоящем документе), как предложено в настоящем документе. В одном варианте осуществления, терапевтическую композицию (например, любую из описанных в настоящем документе композиций) вводят субъекту в первую точку разреза. В одном варианте осуществления, терапевтическую композицию вводят субъекту в первый разрез или через него. В одном варианте осуществления, терапевтическую композицию вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В одном варианте осуществления, терапевтическую композицию вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее.

В некоторых вариантах осуществления, композиция, описанная в настоящем документе, может быть введена субъекту посредством хирургической процедуры. В некоторых вариантах осуществления, введение, например, с помощью хирургической процедуры, включает инъекцию описанной в настоящем документе композиции с помощью устройства для доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо. В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; и инъекцию композиции, описанной в настоящем документе, через устройство доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо.

В некоторых вариантах осуществления, хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; инъекцию композиции, описанной в настоящем документе, через устройство доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг круглого окна и/или овального окна субъекта; и опускание тимпаномеатального лоскута субъекта в анатомическое положение.

В некоторых вариантах осуществления, хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; подготовку круглого окна субъекта; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; приготовление и устройства для доставки, как описано в настоящем документе, и композиции, описанной в настоящем документе, для доставки во внутреннее ухо; инъекцию описанной в настоящем документе композиции через устройство доставки во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг круглого окна и/или овального окна субъекта; опускание тимпаномеатального лоскута субъекта в анатомическое положение.

В некоторых вариантах осуществления, микростапедотомия с помощью лазера включает использование отологического лазера KTP и/или отологического лазера CO2.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит один или несколько векторов AAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одного вектора AAV, все векторы AAV отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит кодирующую область OTOF, например, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит частицу rAAV, содержащую вектор AAV, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, частица rAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления, капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

Например, в одном варианте осуществления, терапевтическую композицию вводят с помощью медицинского устройства, способного создавать множество надрезов в мембране круглого окна. В одном варианте осуществления, медицинское устройство содержит множество микроигл. В одном варианте осуществления, медицинское устройство включает в себя множество микроигл, включающих, как правило, круглый первый аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, примерно 10 микрон. В одном варианте осуществления, медицинское устройство включает основание и/или резервуар, способный удерживать терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления, медицинское устройство включает в себя множество полых микроигл, каждая из которых имеет полость, способную вводить терапевтическую композицию. В одном варианте осуществления, медицинское устройство включает в себя средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

В качестве другого примера, композицию, описанную в настоящем документе, вводят с использованием устройства и/или системы, специально разработанной для внутрикохлеарного пути введения. В некоторых вариантах осуществления, элементы конструкции описанного в настоящем документе устройства могут включать: поддержание стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; способность точно доставлять небольшие объемы с контролируемой скоростью; доставку через наружный слуховой проход хирургом; минимизацию повреждения мембраны круглого окна (RWM) или внутреннего уха, например, структур улитки за пределами RWM; и/или сведение к минимуму обратного просачивания закачиваемой жидкости через RWM.

Устройства, системы и способы, представленные в настоящем документе, также описывают потенциальную возможность безопасной и эффективной доставки композиции во внутреннее ухо для лечения состояний и нарушений, при которых будет полезна доставка композиции, описанной в настоящем документе, во внутреннее ухо, включая, но не ограничиваясь ими, нарушения слуха, например, как описано в настоящем документе.

В качестве другого примера, путем помещения отверстия в подножку стремени и введения через RWM, описанная в настоящем документе композиция распределяется по всей улитке с минимальным разбавлением в месте воздействия. Разработка описываемых устройств позволяет проводить процедуру хирургического введения через наружный слуховой проход человека. Описанные устройства можно удалить из уха после введения некоторого количества жидкости в перилимфу улитки. У субъектов устройство можно продвигать через наружный слуховой проход либо под хирургическим микроскопическим контролем, либо вместе с эндоскопом.

Типовое устройство для использования в любом из описанных в настоящем документе способов описано на ФИГ. 81-84. На фиг.81 показано типовое устройство 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Устройство 10 включает рифленую ручку 12 и адгезив 14 для дистальной ручки (например, эпоксидный состав, такой как loctite 4014), который соединяется с телескопическим держателем иглы гипотрубки 24. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может иметь толщину от примерно 5 мм до примерно 15 мм, или от примерно 5 мм до примерно 12 мм, или от примерно 6 мм до примерно 10 мм, или от примерно 6 мм до примерно 9 мм, или от примерно 7 мм до примерно 8 мм. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может быть полой, чтобы жидкость могла проходить через устройство 10 во время использования. Устройство 10 может также включать в себя адгезив 16 проксимальной ручки на проксимальном конце 18 рифленой ручки 12, узел иглы 26 (показанный на фиг. 82) с ограничителем 28 (показанной на фиг. 82) на дистальном конце 20 устройства 10 и элемент 22 для снятия натяжения. Элемент для снятия натяжения 22 может состоять из материала Santoprene, материала Pebax, полиуретанового материала, силиконового материала, нейлонового материала и/или термопластичного эластомера. Телескопический держатель иглы гипотрубки 24 окружает и поддерживает изогнутую иглу 38 (показана на фиг.82), расположенную внутри него.

Ссылаясь на фиг. 81, ограничитель 28 может состоять из термопластичного материала или пластикового полимера (такого как полимер, отверждаемый УФ-излучением), а также из других подходящих материалов и может использоваться для предотвращения введения изогнутой иглы 38 слишком далеко в слуховой проход (например, чтобы предотвратить введение изогнутой иглы 38 в боковую стенку или другую структуру внутреннего уха). Устройство 10 также может включать коническую часть 23, расположенную между рифленой ручкой 12 и адгезивом 14 дистальной ручки, который соединен с телескопическим держателем иглы гипотрубки 24. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может включать коническую часть 23 на дистальном конце ручки 12. Устройство 10 может также включать в себя трубку 36, гидравлически соединенную с проксимальным концом 16 устройства 10, и действует как линия впуска жидкости, соединяющая устройство с расположенными выше компонентами (например, насосом, шприцем и/или находящимися выше компонентами, которые, в некоторых вариантах осуществления, могут быть соединены с системой управления и/или источником питания (не показаны)). В некоторых вариантах осуществления, изогнутая игла 38 (показана на фиг. 82) проходит от дистального конца 20 через телескопический держатель иглы гипотрубки 24, через коническую часть 23, через рифленую ручку 12 и через элемент 22 для снятия натяжения, и гидравлически соединяется непосредственно с трубкой 36. В других вариантах осуществления, изогнутая игла 38 гидравлически соединяется с полым внутренним пространством рифленой ручки (например, через телескопический держатель иглы гипотрубки 24), который, в свою очередь, гидравлически соединяется на проксимальном конце 16 с трубкой 36. В вариантах осуществления, где изогнутая игла 38 не проходит полностью через внутреннюю часть устройства 10, площадь контакта (например, между перекрывающимися вложенными друг в друга гипотрубками 42), допуски и/или герметики между взаимодействующими компонентами должны быть достаточными для предотвращения вытекания лечебной жидкости из устройства 10 (которое работает при относительно низком давлении (например, от примерно 1 Паскаля до примерно 50 Па, или от примерно 2 Па до примерно 20 Па, или от примерно 3 Па до примерно 10 Па)).

На фиг. 82 показан вид сбоку подузла изогнутой иглы 26 в соответствии с аспектами настоящих описанных вариантов осуществления. Подузел изогнутой иглы 26 включает в себя иглу 38, имеющую изогнутую часть 32. Подузел изогнутой иглы 26 может также включать в себя ограничитель 28, соединенный с изогнутой частью 32. Изогнутая часть 32 включает наклонный наконечник 34 на дистальном конце 20 устройства 10 для прокалывания ушной мембраны (например, RWM). Игла 38, изогнутая часть 32 и скошенная вершина 34 являются полыми, так что через них может протекать жидкость. Угол 46 (как показано на фиг. 84) изогнутой части 32 может варьироваться. Геометрия ограничителя 28 может быть циклической, дискообразной, кольцеобразной, куполообразной и/или другой подходящей формы. Ограничитель 28 может быть сформован на месте на изогнутой части 32. Например, ограничитель 28 может быть расположен концентрически вокруг изогнутой части 32 с использованием адгезива или компрессионного фитинга. Примеры адгезивов включают адгезив, отверждаемый УФ (такой как Dymax 203A-CTH-FT), эластомерные адгезивы, термореактивные адгезивы (такие как эпоксидные или полиуретановые) или эмульсионные адгезивы (такие как поливинилацетат). Ограничитель 28 устанавливается концентрически вокруг изогнутой части 32, так что наклонный наконечник 34 вставляется в ухо на желаемую глубину введения. Изогнутая игла 38 может быть сформирована из прямой иглы с использованием постадийного формования, а также других подходящих методов.

На фиг.83 показан вид в перспективе типового устройства 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Трубка 36 может иметь длину от примерно 1300 мм (размер 11 на фиг.83) до примерно 1600 мм, или от примерно 1400 мм до примерно 1500 мм, или от примерно 1430 мм до примерно 1450 мм. Элемент для снятия натяжения 22 может иметь длину от примерно 25 мм до примерно 30 мм (размер 15 на фиг. 83) или от примерно 20 мм до примерно 35 мм. Ручка 12 может иметь длину примерно 155,4 мм (размер 13 на фиг. 83), или от примерно 150 до примерно 160 мм, или от примерно 140 до примерно 170 мм. Телескопический держатель иглы гипотрубки 24 может иметь две или несколько вложенных гипотрубок, например три вложенных гипотрубки 42A, 42B и 42C, или четыре вложенных гипотрубки 42A, 42B, 42C и 42D. Общая длина гипотрубок 42A, 42B, 42C и узла наконечника 26 (размер 17 на фиг. 83) может составлять от примерно 25 мм до примерно 45 мм, или от примерно 30 мм до примерно 40 мм, или примерно 35 мм. Кроме того, телескопический держатель иглы гипотрубки 24 может иметь длину примерно 36 мм, или примерно от 25 мм до примерно 45 мм, или от примерно 30 мм до примерно 40 мм. Каждая из трех вложенных гипотрубок 42A, 42B и 42C может иметь длину 3,5 мм, 8,0 мм и 19,8 мм, соответственно, плюс или минус примерно 20%. Самая внутренняя вложенная гипотрубка (или самая узкая часть) телескопического держателя иглы гипотрубки 24 может быть расположена концентрически вокруг иглы 38.

На фиг. 84 показан вид в перспективе узла 26 изогнутой иглы, соединенного с дистальным концом 20 устройства 10, в соответствии с аспектами настоящих описанных вариантов осуществления. Как показано на фиг. 84, узел 26 изогнутой иглы может включать иглу 38, соединенную с изогнутой частью 32. В других вариантах осуществления, изогнутая игла 38 может быть одинарной иглой (например, прямой иглой, которая затем изгибается таким образом, чтобы иметь нужный угол 46). Игла 38 может быть иглой калибра 33 или может иметь калибр от примерно 32 до примерно 34 или от примерно 31 до 35. При более тонком калибре, необходимо следить за тем, чтобы трубка 36 не перегибалась и не повреждалась. Игла 38 может быть присоединена к ручке 12 для безопасного и точного введения иглы 38 во внутреннее ухо. Как показано на фиг. 84, узел 26 изогнутой иглы может также включать ограничитель 28, расположенный вокруг изогнутой части 32. На фиг. 84 также показано, что изогнутая часть 32 может включать наклонный наконечник 34 для прокалывания мембраны уха (например, PBM). Пробка 28 может иметь высоту 48 примерно 0,5 мм, или от примерно 0,4 мм до примерно 0,6 мм, или от примерно 0,3 мм до примерно 0,7 мм. Изогнутая часть 32 может иметь длину 52 примерно 1,45 мм, или примерно от 1,35 мм до примерно 1,55 мм, или примерно от 1,2 мм до примерно 1,7 мм. В других вариантах осуществления, изогнутая часть 32 может иметь длину более 2,0 мм, так что расстояние между дистальным концом пробки 28 и дистальным концом изогнутого наконечника 34 составляет от примерно 0,5 мм до примерно 1,7 мм или примерно от 0,6 мм до примерно 1,5 мм, или от примерно 0,7 мм до примерно 1,3 мм, или от примерно 0,8 мм до примерно 1,2 мм. На фиг.84 показано, что ограничитель 28 может иметь геометрию, которая может быть цилиндрической, дискообразной и/или куполообразной. Специалист в данной области техники поймет, что можно использовать и другие геометрические формы.

Далее описание подробно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, описание никоим образом не следует рассматривать как ограничивающееся следующими примерами, а скорее следует рассматривать как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате представленных в настоящем документе идей.

Другие анализы, в том числе описанные в разделе «Примеры» настоящего документа, а также те, которые известны в данной области техники, также могут быть использованы для оценки нуклеиновых кислот слуховых полипептидов и конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению.

Без дополнительного описания считается, что специалист в данной области может, используя предыдущее описание и следующие иллюстративные примеры, получить и использовать соединения по настоящему изобретению и применять заявленные способы на практике. Следующие рабочие примеры конкретно указывают на различные аспекты настоящего описания и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом оставшуюся часть описания.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Характеризация гена отоферлина человека, гомологов, ортологов.

Ген отоферлина и соответствующая мРНК представлены ниже.

Пример 2: Конструирование вирусных векторов

Рекомбинантный AAV получают путем трансфекции способом без аденовирусов, который используют Xiao et al. J Virol 1999, 73(5):3994-4003. Цис-плазмиды с AAV ITR, транс-плазмиду с генами AAV Rep и Cap и хелперную плазмиду с жизненно-важной областью из генома аденовируса котрансфицируют в клетки 293 в соотношении 1:1:2. Используемые в настоящем документе векторы AAV экспрессируют отоферлин человека или отоферлин мыши в соответствии с несколькими стратегиями двойного вектора с использованием конструкций, описанных ниже. AAV серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 готовят для инкапсулирования трех наборов конструкций отоферлина для тестирования (i) стратегии конкатемеризации-транс-сплайсинга, (ii) гибридной стратегии интронно-гомологичной рекомбинации-транс-сплайсинга и (iii) стратегии экзонной гомологичной рекомбинации, как описано Pryadkina et al. Meth Clin Devel 2015, 2:15009.

Пример 3: Клонирование компонентов OTOF

Библиотеки олиго-dT и кДНК со случайным примированием конструируют из poly(A)+ мРНК всего плода человека, мозга взрослого человека, сердца, почки и сердца эмбриона мыши, как описано Yasunaga et al. Am J Genet 2000, 67:591-600. На этих библиотеках проводят эксперименты RACE-PCR с использованием линкерных праймеров и серии праймеров, выбранных из последовательности кДНК отоферлина. Продукты ПЦР непосредственно клонируют в вектор pGEM-T Easy и секвенируют. Для выделения длинной формы кДНК человека (7 т.н.) конструируют обратный праймер (5’-TTCACCTGGGCCCGCA-GCATCCT-3' (SEQ ID NO: 29)) из последовательности, кодирующей а.к. отоферлина (Yasunaga et al., 1999) (GenBank 107403).

Суммарные РНК экстрагируют из улитки мыши с использованием способов, описанных в Strenzke et al., EMBO J. 35(23):2519-2535, 2016. Эксперименты ОТ-ПЦР проводят с различными источниками РНК мыши и человека в соответствии с набором

GeneAmp RNA PCR. Две пары праймеров используют для воссоздания кДНК мыши, полученных из мозга и улитки, один из экзона 1 5'-UTR (5'-AGGCGTGTGAGCCACACTCCACCA-3' (SEQ ID NO: 30)) и экзона 22 (5'-CATAACCTCAGCTTGTCCCGAACA-3' (SEQ ID NO: 31)), и другой из экзона соединения 18-19 (5'-GGCCCCAGATCACGGACAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 32)) и экзона 48 3'-UTR (5'-GGCCAGTACACCTGATTCACACT-3' (SEQ ID NO: 33)). Чтобы восстановить всю 5' часть длинной формы кДНК головного мозга человека, используют праймеры, полученные из экзона 1 5'-UTR (5'-GGAGGAGGCAGCGGCAGAGAAGA-3' (SEQ ID NO: 34)) и экзона 22 (5'-TTCACCTGGGCCCGCAGCATCCT-3' (SEQ ID NO: 35)).

Для стратегии конкатемеризации-транс-сплайсинга, две кассеты составляют так, что 5' кассета включает синтетический промотор, ориентированный на волосковые клетки, химерный интрон (β-глобин), консенсусную последовательность Козака, экзоны 1-26 отоферлина и половину интрона 26 отоферлина (составляющую 3836 т.н., или 3494 т.н. кДНК отоферлина, соответствующие экзонам 1-26, плюс первые 342 т.н. интрона 26), и 3' кассета включает вторую половину интрона 26 (342 т.н.), экзоны 27-48 (3843 т.н.) отоферлина и сигнальную последовательность полиаденилирования. В некоторых примерах, промотор, ориентированный на волосковые клетки, не требуется для экспрессии белка отоферлина во внутренней слуховой волосковой клетке. Для стратегии интронно-гомологичной рекомбинации-сплайсинга, кассеты из стратегии конкатемеризации-сплайсинга, описанной выше, модифицируют таким образом, что полноразмерный интрон 26 отоферлина добавляется вместо половины интрона 26 в обеих плазмидах.

Для стратегии экзонной гомологичной рекомбинации, две кассеты составлены таким образом, что 5' кассета включает промотор, ориентированный на волосковые клетки, химерный интрон, консенсусную последовательность Козака и экзоны 1-28 (первые 3776 т.н. кДНК отоферлина), и 3' кассета включает экзоны 23-48 (последние 4446 т.н. кДНК отоферлина) и сигнальную последовательность полиаденилирования. Область гомологии между двумя кассетами составляет 885 т.н.

Пример 4: Создание и очистка вирусных частиц

Рекомбинантный AAV-1 продуцируют с использованием протокола тройной трансфекции и очищают двумя последовательными градиентами плотности хлорида цезия (CsCl), как описано Pryadkina et al. Mol Ther 2015, 2:15009. В конце второго центрифугирования, 11 фракций по 500 мкл восстанавливают из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищают путем диализа в 1x PBS. Фракции анализируют с помощью дот-блоттинга для определения тех, которые содержат геномы rAAV. Номер вирусного генома (вг) каждого препарата определяют способом количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома вектора AAV (Bartoli et al. Gene Ther 2006, 13:20-28).

Пример 5: Составление вирусных частиц

ААВ, продуцируемый в титре 1e14 вг/мл, готовят в разведениях 3,2e13, 1,0e13, 3,2e12, 1,0e12 вг/мл в искусственной перилимфе. Искусственную перилимфу готовят путем объединения следующих реагентов в мМ: NaCl 120; KCl, 3,5; $CaCl_2$, 1,5; глюкоза 5,5; HEPES, 20. Искусственную перилимфу титруют с NaOH для доведения ее pH до 7,5 (общая концентрация Na^+ 130 мМ) (Chen et al. J Controlled Rel 2005, 110:1-19).

Пример 6: In vitro демонстрация продуцирования мРНК и белка OTOF (анти-OTOF антитело)

Чтобы подтвердить, что векторы AAV-OTOF способны успешно трансдуцировать клетки млекопитающих in vitro, эпителиальные клетки сетчатки человека и эксплантаты улитки новорожденных мышей инкубируют с AAV-OTOF в титрах 3,2e13, 1,0e13, 3,2e12, 1,0e12, содержащих частицы вирусного генома (вг/мл) и анализируют уровни ДНК, мРНК и белка отоферлина, как описано ранее (Duncker et al., 2013 J Neurosci 33(22):9508-9519). Антитела против отоферлина мыши получают от Abcam и используют, как описано Engel et al., 2006 Neurosci 143:837-849.

Пример 7: Описание типового устройства

Состав AAV-OTOF доставляется в улитку с помощью специального микрокатетера, сконструированного для последовательного и безопасного проникновения в RWM. Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий доставку, может войти в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM. Дистальный конец микрокатетера состоит, по меньшей мере, из одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон, которая создает перфорации в RWM, достаточные для проникновения AAV-OTOF в перилимфу улитки барабанной лестницы со скоростью примерно 1 мкл/мин, но заживающие без хирургического вмешательства. Оставшуюся часть микрокатетера, расположенную проксимально к микроигле(ам), загружают составом AAV-OTOF/искусственной перилимфы с титром приблизительно 1e13 вг/мл. Проксимальный конец микрокатетера соединен с микроманипулятором, который позволяет осуществлять точные инфузии малого объема со скоростью примерно 1 Тл/мин.

Пример 8. Животная модель 1: старые мыши.

Спасение отоферлина кохлеарной доставкой AAV-OTOF оценивают на трех моделях мышей с нокаутом OTOF (моделях мышей, описанных в Longo-Guess et al. Hearing Res 2007, 234(1-2):21-28; Roux et al. Cell 2006, 127:277-289; и Reisinger et al., J. Neurosci. 31(13):4886-4895, 2011). Эксперименты по спасению тестируют на новорожденных (P1), молодых (P6 или P12) и взрослых (P42) мышах, чтобы оценить окно послеродового лечения по отношению к стадии развития улитки.

Исходный слуховой ответ ствола мозга (ABR) и ото-акустические выделения продуктов искажения (DPOAE) измеряют у молодых и взрослых мышей (n=32), с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (IHC) и наружных волосковых клеток (OHC) до лечения. Ожидается, что все животные будут демонстрировать характерный аудиометрический профиль дисфункции отоферлина, т. е. аномальные ABR на протестированных звуковых частотах, но нормальные DPOAE, что свидетельствует о дисфункциональной передаче сигнала IHC и нормальной функции OHC (Yasunaga et al. 2000, Am J Hum Genet 67: 591-600).

После исходных измерений ABR и DPOAE, 0,3 мкл AAV1-OTOF в титрах 1,0e13, 3,2e12 и 1,0e12 вг/мл вводят в левую лестницу барабанной перепонки молодых и взрослых мышей (n=32), как описано ниже. Эквивалентные титры инъецируют в левую барабанную лестницу новорожденных мышей, но в объеме 0,2 мкл (n=16) (хирургическая процедура описана ниже). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве необработанного контроля. Измерения ABR и DPOAE снова проводят с двух сторон у молодых и взрослых животных через 1, 5 и 10 дней после хирургической процедуры. Через 4 недели (n=24) и 12 недель (n=24) после процедуры, проводят дополнительные двусторонние измерения ABR и DPOAE у всех животных в неонатальных, молодых и взрослых группах (всего n=48), и животных впоследствии умерщвляют и удаляют их улитки.

У половины умерщвленных животных (n=4 из каждой группы через 4 и 12 недель после лечения) проводят иммунное окрашивание для идентификации структур волосковых клеток и оценки экспрессии белка OTOF вдоль сенсорного эпителия улитки. Антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина используют, как описано ранее (Duncker et al. 2013, J Neurosci 33(22):9508-9519). На исходном уровне, серединные и апикальные витки кортиева органа, общее количество волосковых клеток и тех волосковых клеток, которые экспрессируют OTOF, подсчитывают в пределах 200 мкм области, всю длину кортиева органа делят на три части одинаковой длины, обозначенные как базальная, средняя и апикальная области.

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

Пример 9: Животная модель 1А: Хирургический способ на старых мышах

AAV-OTOF, полученный в искусственной перилимфе, вводят мышам в барабанную лестницу, как описано Shu et al. 2016 (Shu Yilai, Tao Yong, Wang Zhengmin, Tang Yong, Li Huawei, Dai Pu, Gao Guanping, and Chen Zheng-Yi. Human Gene Therapy. June 2016, ahead of print. doi:10.1089/hum.2016.053). Самцов мышей шестинедельного возраста анестезируют с помощью внутрибрюшинной инъекции ксилазина (20 мг/кг) и кетамина (100 мг/кг). Температуру тела поддерживают на уровне 37°C с помощью электрической грелки. Делают разрез в правой заушной области и обнажают барабанный пузырь. Пузырь перфорируют хирургической иглой, и маленькое отверстие расширяют, чтобы обеспечить доступ к улитке. Кость латеральной стенки улитки барабанной лестницы истончают с помощью стоматологической бормашины так, чтобы перепончатая латеральная стенка оставалась интактной. Нанолитровую систему микроинъекций в сочетании со стеклянной микропипеткой используют для доставки в общей сложности приблизительно 300 нл AAV-OTOF в искусственной перилимфе к барабанной лестнице со скоростью 2 нл/сек. Стеклянную микропипетку оставляют на 5 минут после инъекции. После кохлеостомии и инъекции, отверстие в барабанном пузыре герметизируют стоматологическим цементом, и мышцы и кожу зашивают. Мышам дают проснуться от анестезии, и их боль контролируют с помощью 0,15 мг/кг гидрохлорида бупренорфина в течение 3 дней.

Пример 10. Животная модель 2: реципрокный микронасос у морской свинки.

Хирургическая процедура

AAV-OTOF, приготовленный в искусственной перилимфе, вводят морским свинкам для оценки распределения и токсичности после внутрикохлеарной доставки с помощью реципрокного микронасоса, как описано Tandon et al. Lab Chip 2015 (DOI: 10.1039/c5lc01396h). Самцов морских свинок весом приблизительно 350 г каждый (n=16) анестезируют комбинацией пентобарбитала натрия (нембутал; 25 мг $кг^{-1}$, внутрибрюшинно), фентанила (0,2 мг $кг^{-1}$, внутримышечно) и галоперидола (10 мг $кг^{-1}$, внутримышечно). Лидокаин с эпинефрином вводят подкожно в место разреза в качестве местного анестетика. Используя дорсальный доступ, в пузыре делают отверстие диаметром 5 мм и создают кохлеостому примерно на 0,5 мм дистальнее мембраны круглого окна. Канюлю микронасоса (описанную ниже) вводят в кохлеостому, вводят в улитку на 3 мм апикально и приклеивают к пузырю обычным цианоакрилатным клеем. Для измерения сложного потенциала действия (CAP), серебряный проволочный электрод с перфторалкоксиалкановой изоляцией (диаметр без покрытия 203 мкм) вставляют рядом с нишей круглого окна и приклеивают к пузырю.

Процедуры измерения ото-акустических выделений продукта искажения (DPOAE) и CAP выполняют, как описано ранее в Tandon et al. Lab Chip 2015 (DOI: 10.1039/c5lc01396h). DPOAE измеряют до и после процедуры кохлеостомии на характеристических частотах: 32, 24, 16, 12, 8, 5,6, 4 и 2,78 кГц, чтобы отслеживать любые повреждения, возникающие в результате операции.

Описание микронасоса

AAV-OTOF с максимальным титром 1e14 вг/мл вводят морской свинке с помощью микронасоса, как описано Tandon et al. Lab Chip 2015 (DOI: 10.1039/c5lc01396h). Система микронасосов имеет 4 выбираемых порта. Эти порты подключены к: (i) большому жидкостному конденсатору, используемому для искусственного хранения перилимфы; (ii) выходному отверстию, которое соединяется с улиткой; (iii) выходу из интегрированного резервуара AAV-OTOF; (iv) входу в интегрированный резервуар AAV-OTOF. Каждый порт гидравлически соединен с центральной насосной камерой, и каждый индивидуально обращается к клапану. Последовательность событий для реципрокной доставки AAV-OTOF следующая: (i) запускается внутренний цикл обновления AAV-OTOF, переносящий AAV-OTOF из резервуара AAV-OTOF в основную линию ввода-вывода; (ii) AAV-OTOF вводят в улитку, и некоторое количество искусственной перилимфы сливают из конденсатора для хранения искусственной перилимфы; (iii) первые две стадии можно повторить несколько раз для дополнительных доз; (iv) после того, как AAV-OTOF позволяют диффундировать в течение некоторого времени, из улитки отбирают объем перилимфы, равный объему, введенному на стадиях (i)-(iii), пополняя искусственный конденсатор для хранения перилимфы. Этот процесс приводит к чистой доставке лекарственного средства с нулевым чистым объемом жидкости, добавляемым в улитку.

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

Экстренная доставка лекарственного средства у морских свинок

В микронасос загружают AAV-OTOF и искусственную перилимфу, и канюлю вводят в кохлеостому, выполненную в области улитки между локациями с характерной частотной чувствительностью 24 и 32 кГц, и продевают апикально на 3 мм, оканчивая в области 12-16 кГц. Тесты слуха на исходном уровне DPOAE и CAP проводят до начала инфузии AAV-OTOF/искусственной перилимфы. Затем насос активируют, и каждые 5 минут вливают примерно 1 мкл искусственной перилимфы, пока в улитку не будет доставлено примерно 10 мкл искусственной перилимфы. После 20 мин ожидания из улитки отбирается примерно 10 мкл перилимфы. Затем инициируют доставку AAV-OTOF со скоростью примерно 1 мкл каждые 5 минут до тех пор, пока не будет доставлено в общей сложности примерно 10 мкл жидкости.

Животных умерщвляют через 1 неделю, 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев после обработки (n=4 на группу) и извлекают их улитки. Степень трансдукции AAV и экспрессии OTOF вдоль кортиева органа оценивают с помощью иммунного окрашивания анти-OTOF антителами. Антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a) и поддерживающих клеток (Sox2) используют для количественного определения IHC, OHC, поддерживающих клеток и морфологии стереоцилий. Окрашивание аннексином V используют для оценки признаков апоптоза в клетках сенсорного эпителия улитки.

Пример 11: Животная модель 3: токсикоз крупных животных у овец

AAV-OTOF, приготовленный в искусственной перилимфе, вводят молодым овцам для оценки распределения и токсичности после доставки в улитку посредством транс-RWM инфузии. Базовый слуховой ответ ствола мозга (ABR) и ото-акустическое выделение продуктов искажения (DPOAE) измеряют у самок овец в возрасте 3 месяцев (n=40) с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (IHC) и наружных волосковых клеток (OHC) до лечения. После исходных измерений ABR и DPOAE в левую барабанную лестницу овцы инъецируют 20 мкл AAV1-OTOF с титрами

1,0e14, 3,2e13, 1,0e13 и 3,2e12 вг/мл (n=10 на группу). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве необработанного контроля. Измерения ABR и DPOAE снова проводят с обеих сторон через 1, 5 и 10 дней после хирургической процедуры. Через 6 месяцев после процедуры, у всех животных проводят дополнительные двусторонние измерения ABR и DPOAE, и затем животных умерщвляют и удаляют их улитки.

У половины умерщвленных животных (n=5 из каждой когорты доз) проводят иммунное окрашивание для идентификации структур волосковых клеток и оценки экспрессии белка OTOF вдоль сенсорного эпителия улитки. Антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина используют, как описано ранее (Duncker et al. 2013, J Neurosci 33(22):9508-9519). На базальном, среднем и апикальном витках кортиева органа подсчитывают общее количество волосковых клеток и тех волосковых клеток, которые экспрессируют OTOF в пределах 200 мкм.

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

Пример 12: Животная модель 3А: CRISPR созданная трансгенная модель крупного животного (овца)

Создание плазмиды, коэкспрессирующей Cas9 и sgRNA

Плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (плазмиду Addgene #42230) расщепляют с помощью BsbI, дефосфорилируют с использованием Antartic Phosphatase и линеаризованный вектор подвергают гель-очистке. Чтобы создать бицистронный вектор (pX330-cas9-OTOF), экспрессирующий Cas9 и sgRNA против OTOF, пару олигонуклеотидов для нацеливания на экзон 1 отоферлина отжигают, фосфорилируют и лигируют с линеаризованным вектором (Cong et al. 2013 Science 339(6121):819-23).

Анализ редактирования генома в клетках

Линию клеток астроглии овцы A15 (Vilette et al., 2000 In Vitro Cell Dev Biol Anim 36(1):45-9) поддерживают в DMEM в 10% эмбриональной бычьей сыворотке, 2 мМ глутамина, 1% пирувата натрия и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки трансфицируют в 24-луночные планшеты с 2 мкг pX330-cas9-OTOF, совместно экспрессирующего Cas9 и енРНК против отоферлина, с использованием реагента липофектамина LTX. Через три дня геномную ДНК из трансфицированных клеток извлекают и количественно определяют с помощью спектрофотометра NanoDrop2000, измеряя *соотношения* A260/A*280 и* A260/A*230 для учета чистоты образца.*

Активность генной мутации последовательности енРНК в локусе-мишени экзона 1 OTOF количественно оценивают с использованием анализа обнаружения несоответствия T7EI. Представляющую интерес последовательность ДНК подвергают ПЦР-амплификации с полимеразой высокой точности (полимераза слияния Herculase II) с использованием специфических праймеров. Полученный продукт ПЦР затем денатурируют и медленно повторно отжигают (95°C, 2 мин; от 95°C до 85°C, -2°C/сек; от 85°C до 25°C, -1°C/сек) для получения гомодуплексной/гетеродуплексной смеси. Затем его расщепляют 5 ед. ферментом рестриктазы T7EI при 37°C в течение 30 минут. Продукты перевара разделяют электрофорезом в 2% агарозном геле. Соотношение расщепленных и нерасщепленных продуктов используют для расчета частоты NHEJ, как описано ранее с использованием программного обеспечения Image J (Menoret et al. 2011 Advanced protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual. Heidelberg: Springer. p117-36). Частота NHEJ рассчитывают как % модификации гена=100 x (1-(1-расщепленная фракция)^(1/2).

Продуцирование енРНК и Cas9 мРНК

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

мРНК Cas9 транскрибируют с использованием расщепленной PmeI плазмиды экспрессии Cas9 JDS246 (плазмиды Addgene # 43861) и набора для транскрипции mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA в соответствии с руководством производителя. После завершения транскрипции проводят реакцию poly(A) хвоста и обработку ДНКазой I. Как мРНК Cas9, так и енРНК очищают с использованием набора MEGAclear и элюируют в элюирующем буфере.

Получение эмбрионов in vitro

Эмбрионы получают путем оплодотворения *in vitro в* соответствии с обычной процедурой, описанной ранее (Crispo et al. 2014 Transgenic Res, 24(1):31-41). Коротко, яичники со скотобойни транспортируют в лабораторию, и комплексы «кумулюс-ооцит» (СОС) аспирируют в восстановительной среде. Отобранные СОС помещают в среду созревания на 24 ч в 5% CO2 в атмосфере увлажненного воздуха при 39°C. Затем разросшиеся СОС осеменяют 100 мкл каплями 1 x 106 дозой замороженно-размороженной спермы, селектированной восходящей миграцией способом флотации. Внесение удобрений проводят в 5% CO2 с увлажненной атмосферой при 39°C в течение 22 ч.

Микроинъекция в зиготы

Вскоре после оплодотворения, 572 предполагаемых зиготы случайным образом распределяют по трем экспериментальным группам, которым будут вводиться микроинъекции (группа CRISPR, n=200; и группа буфера, n=200) или нет (контрольная группа, n=200). Микроинъекцию группы CRISPR осуществляют в цитоплазму с помощью 5 нг/мкл енРНК и 20 нг/мкл мРНК Cas9, разведенных в буфере для инъекций (10 мМ Трис, pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТК), в то время как буферную группу вводят той же процедурой, но только с буфером. Наконец, инъецированные и не инъецированные эмбрионы переносят в культуральную среду под минеральным маслом, в 5% CO2, 5% O2 и 90% N2 во влажной атмосфере при 39°C. Скорость расщепления на 2 день (количество расщепленных зигот на общее количество ооцитов) и скорость развития на 6 день (морулы и бластоцисты на общее количество ооцитов) регистрируют для всех экспериментальных групп. После 6 дня, ДНК 20 эмбрионов группы CRISPR анализируют с помощью секвенирования по Сэнгеру для обнаружения мутации на уровне гена OTOF.

Для определения эффективности системы in vivo, 53 бластоцисты, полученные с помощью микроинъекции зиготы CRISPR/Cas9, переносят 29 самкам-реципиентам. Только ранние бластоцисты, бластоцисты и расширенные бластоцисты, классифицированные как отличные или хорошие (т.е. степень 1, как определено в Stringfellow et al. 2010, Manual of the International Embryo Transfer Society), переносят на 6 день после оплодотворения. Перенос эмбрионов осуществляют с помощью минимально инвазивной хирургии с помощью лапароскопии, чтобы поместить эмбрионы в краниальную сторону ипсилатерального рога матки до желтого тела. Овец-реципиентов предварительно синхронизируют на 6 день эстрального цикла с использованием стандартного протокола для контроля овуляции, описанного ранее, как описано Menchaca et al. 2004, Reprod Fertil Dev. 16(4):403-413.

Отслеживание плодов и ягнят

Диагностику беременности и развитие плода проводят на 30 и 105 день, соответственно, с помощью ультразвукового исследования в B-режиме с зондом 5 и 3,5 МГц. День 0 эксперимента определяют как момент оплодотворения эмбриона. Для изучения развития плода на 105 день беременности измеряют несколько параметров: диаметр грудной клетки, бипариетальный диаметр, затылочно-носовую длину и частоту сердечных сокращений. При родах регистрируют продолжительность беременности, пол, ректальную температуру, частоту сердечных сокращений и дыхания, массу тела, периметр грудной клетки, бипариетальный диаметр, длину от темени до крестца и затылочно-носовую длину, высоту в холке, высоту в бедрах, ширину в бедрах и ширину в груди. Массу тела и морфометрические показатели определяют при рождении, а также через 15, 30 и 60 дней.

Идентификация и генотипирование трансгенных животных

Образцы кожи и мышц конечностей ягнят берут через семь дней после рождения и проводят анализ T7EI, вестерн-блоттинг и гистологические исследования, чтобы идентифицировать и охарактеризовать основателей KO и участки вне мишени. Общую ДНК выделяют из биоптатов кожи всех животных и из мышц некоторых животных. Образцы анализируют с помощью капиллярного электрофореза. Генотипирование экзона 1 OTOF проводят прямым секвенированием ПЦР ампликонов, и в биоптатах мышц, дополнительным секвенированием выделенных бактериальных клонов с индивидуальными последовательностями ампликонов.

Анализ экспрессии отоферлина

Вестерн-блоттинг проводят для определения наличия миостатина в мышечном волокне. Равные количества общих белков подвергают электрофорезу в 12% (об./об.) геле и электрофоретически переносят на ПВДФ мембрану. В вестерн-блоттинге используют моноклональные антитела мыши против отоферлина. Промытые мембраны инкубируют с разведением 1:50000 вторичных антител, связанных с пероксидазой хрена (HPR). Активность HPR определяют с помощью вестерн-блоттинга хемилюминесценции.

Неотложная терапия AAV-OTOF на модели трансгенных овец

AAV-OTOF, приготовленный в искусственной перилимфе, вводят трансгенным овцам с нокаутом OTOF для оценки способности восстанавливать нормальную слуховую функцию после доставки в улитку с помощью транс RWM инфузии. Базовый слуховой ответ ствола мозга (ABR) и ото-акустическое выделение продуктов искажения (DPOAE) измеряют у самок овец в возрасте 3 месяцев (n=30) с двух сторон для оценки функции внутренних волосковых клеток (IHC) и наружных волосковых клеток (OHC) до лечения. После исходных измерений ABR и DPOAE, в левую барабанную лестницу овцы вводят 20 мкл AAV1-OTOF с титрами 1,0e14, 3,2e13 и 1,0e13 вг/мл (n=10 на группу). Правое ухо каждого животного оставляют в качестве необработанного контроля. Измерения ABR и DPOAE снова проводят с обеих сторон через 1, 5 и 10 дней после хирургической процедуры. Через 6 месяцев после процедуры у всех животных проводят дополнительные двусторонние измерения ABR и DPOAE, и затем животных умерщвляют и удаляют их улитки.

У половины умерщвленных животных (n=5 из каждой когорты доз) проводят иммунное окрашивание для идентификации структур волосковых клеток и оценки экспрессии белка OTOF вдоль сенсорного эпителия улитки. Антитела против маркеров волосковых клеток (Myo7a), поддерживающих клеток (Sox2) и отоферлина используют, как описано ранее (Duncker et al. 2013, J Neurosci 33(22):9508-9519). На базальном, среднем и апикальном витках кортиева органа подсчитывают общее количество волосковых клеток и тех волосковых клеток, которые экспрессируют OTOF в пределах 200 мкм.

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

Пример 13: Клинический пример на человеке (лечение детей)

Субъект находится под общим наркозом. Хирург приближается к барабанной перепонке со стороны наружного слухового прохода, делает небольшой разрез у нижнего края наружного слухового прохода, где он встречается с барабанной перепонкой, и приподнимает барабанную перепонку в виде лоскута, обнажая полость среднего уха. С помощью хирургического лазера делает небольшое отверстие (примерно 2 мм) в подножке стремени. Затем хирург проникает через мембрану круглого окна с помощью микрокатетера, загруженного раствором AAV-OTOF, приготовленным в искусственной перилимфе, с титром 1e13 вг/мл. Микрокатетер соединен с микроманипулятором, который вливает примерно 20 мкл раствора AAV-OTOF со скоростью примерно 1 мкл/мин. По завершении инфузии AAV-OTOF, хирург извлекает микрокатетер и закрывает отверстия в пластине основания стремени и RWM пластырем из гелевой пены. Операцию завершают заменой лоскута барабанной перепонки.

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

Образцы материнской крови (20-40 мл) собирают в пробирки для бесклеточной ДНК. Из каждого образца выделяют, по меньшей мере, 7 мл плазмы по протоколу двойного центрифугирования при 2000 g в течение 20 минут, затем при 3220 g в течение 30 минут с переносом надосадочной жидкости после первого центрифугирования. скДНК выделяют из 7-20 мл плазмы с использованием набора QIAGEN QIAmp Circulating Nuclei Acid и элюируют в 45 мкл буфера TE. Чистую материнскую геномную ДНК выделяют из лейкоцитарной пленки, полученной после первого центрифугирования.

Комбинируя термодинамическое моделирование анализов для выбора зондов с минимальной вероятностью взаимодействия зонд-зонд с подходами к амплификации, описанными ранее (Stiller et al. 2009 Genome Res 19(10):1843-1848), можно достичь мультиплексирования 11000 анализов. Образцы материнской бкДНК и материнской геномной ДНК предварительно амплифицируют в течение 15 циклов с использованием 11000 целевых анализов, и аликвоту переносят во вторую реакцию ПЦР из 15 циклов с использованием вложенных праймеров. Образцы готовят для секвенирования путем добавления меток со штрих-кодом в третьем раунде ПЦР из 12 циклов. Мишени включают SNP, соответствующие 100 мутациям в хромосоме 2, которые, как известно, приводят к потере функции отоферлина (Zhang et al. 2016 Clin Genetics Jan 27). Затем ампликоны секвенируют с помощью секвенатора Illumina HiSeq. Выравнивание последовательности генома выполняют с использованием коммерчески доступного программного обеспечения.

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

Получение одного вирусного вектора

Отоферлин мыши, лишенный N-концевых доменов, может восстанавливать фенотип нокдауна у данио с нокаутом отоферлина (Chatterjee et al. Mol Cell Biol 2015, 35(6):1043-1054). Однако у млекопитающих миссенс-мутации в доменах C2B и C2C связаны с потерей слуха (Longo-Guess et al., 2007 Hear Res, 234:21-28; Mirghomizadeh et al., 2002 Neurobiol Dis 10:157-164), предполагая, что эти домены необходимы для нормальной функции отоферлина, связанной со слухом, у высших видов. Домен C2A отоферлина млекопитающих не связывает Ca^{2+}, тогда как все другие домены C2 связывают Ca^{2+} с умеренным (20-50 мкМ) или низким (400-700 мкМ) сродством в отсутствие кислых липидов. Домены C2D и C2E связывают Ca^{2+}, а также фосфатидилсерин (PS) Ca^{2+}-зависимым образом. Получают кДНК, кодирующую усеченную форму отоферлина, в которой отсутствуют домены C2A, C2D и C2E. Эта кДНК подходит для упаковки в векторе AAV.

Конструкцию усеченного отоферлина (OTOFΔC2ADE) получают и клонируют из исходной плазмиды отоферлина дикого типа, кодирующей полный ген OTOF, как описано Padmanarayana et al. 2014 Biochem 53:5023-5033. Делецию кодирующей области доменов C2 выполняют с помощью ПЦР мутагенеза с использованием олигонуклеотидов, охватывающих домен, и набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с использованием подхода с двойным мутагенным праймером. Коротко, ПЦР проводят следующим образом: 95°C в течение 3 минут; 18 циклов при 95°C в течение 15 секунд, 65°C в течение 1 минуты и 68°C в течение 12 минут; и 68°C в течение 7 минут. Продукт ПЦР переваривают DpnI, клонируют в вектор DSC-B и трансформируют в бактериальные клетки DH5alpha или XL10-Gold. Плазмидную ДНК выделяют с помощью мини-препаратов и затем секвенируют.

Для конструкции AAV используют плазмиду, содержащую промотор CBA, химерный интрон (β-глобин), консенсусную последовательность Козака, кДНК OTOFΔC2ADE и сигнальную последовательность полиаденилирования. Рекомбинантный AAV получают путем трансфекции способом без аденовируса, который используют Xiao et al. J Virol 1999, 73(5):3994-4003. Цис-плазмиды с AAV ITR, транс-плазмиду с генами AAV Rep и Cap и хелперную плазмиду с эссенциальной областью из генома аденовируса котрансфицируют в клетки 293 в соотношении 1:1:2. Серотипы AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 получают для инкапсулирования конструкции кДНК OTOFΔC2ADE.

Получение CELiD

Ген отоферлина получают для невирусного переноса гена, как описано Li et al. 2013, PLoS ONE 8(8):e69879. Сначала клетки Spodoptera frugiperda Sf9 выращивают в виде суспензии в бессывороточной среде. Ген бластицидин-S-дезаминазы (bs) подвергают ПЦР амплификации из pIB/V5-His/CAT с использованием следующей пары праймеров:

5’-ATAAGCTTACGCTCAGTGGAACGAAAAC-3' (SEQ ID NO: 36) и

5’-ATAAGCTTGACGTGTCAGTGTCAGTCCTGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 37).

Продукт ПЦР размером 865 т.н. расщепляют HindIII и лигируют в переваренный HindIII pFBGR. Клетки Sf9 трансфицируют pFBGR-bsd с использованием Cellfectin Transfection Reagent. Через три дня после трансфекции, устойчивые к антибиотикам клетки отбирают путем добавления бластицидина-S HCl (50 мкг/мл) в среду для выращивания. Через две недели в селективной среде, бластицидин-резистентные (bsd^r) клоны получают методами разведения отдельных клеток или прямого переноса колоний. Клоны bsd^r размножают в среде для культивирования клеток насекомых с добавлением 10% FBS и бластицидина-S HCl (10 мкг/мл) в течение 2-3 дополнительных пассажей, затем возвращают в бессывороточную среду с 10 мкг/мл бластицидина-S HCl. После дополнительных 12 пассажей, бластицидин-S HCl исключают из среды, и клеточные линии размножают для анализа. Для функционального скрининга, клональные клеточные линии Sf9/ITR-OTOF инфицируют (MOI=5) рекомбинантным бакуловирусом Bac-Rep, экспрессирующим белки Rep78 и Rep52 AAV типа 2, и анализируют на индуцированную экспрессию OTOF.

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

Клональные клетки Sf9/ITR-OTOF высевают в концентрации 2e6 клеток/мл и инфицируют Bac-Rep (MOI=1-3). Жизнеспособность и диаметр клеток контролируют ежедневно до тех пор, пока диаметр клеток не увеличится до 18-20 мкм (диаметр не инфицированных клеток 14-15 мкм), что указывает на то, что клетки находятся на поздних стадиях вирусной инфекции. Внехромосомную ДНК экстрагируют из инфицированных Bac-Rep клеток Sf9/ITR-GFP с использованием имеющегося в продаже набора для выделения плазмид. Продуцирование CELiD отслеживают электрофорезом в агарозном геле и окрашиванием внехромосомной ДНК бромидом этидия. ДНК CELiD продуцируют в родительских клетках Sf9 путем коинфекции двумя отдельными бакуловирусными векторами экспрессии (BEV): Bac-Rep и вторым BEV, несущим фланкированный ITR трансген, такой как Bac-OTOF. Зараженные клетки Sf9 собирают, когда средний диаметр клеток увеличивается на 4-5 мкм, и долю жизнеспособности снижают до 80-90%. ДНК CELiD выделяют с использованием имеющегося в продаже набора для очистки плазмид.

Клональные клетки Sf9/ITR-OTOF инокулируют различными количествами исходного материала Bac-Rep. Клетки периодически собирают и выделяют внехромосомную ДНК с использованием имеющегося в продаже набора для выделения ДНК. Экстрагированную ДНК исследуют либо с помощью электрофореза в агарозном геле, либо с помощью ПЦР с парами OTOF-специфичных праймеров для количественного определения количества ДНК CELiD. Для вестерн-блоттинга, клеточные белки фракционируют электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле и переносят на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны инкубируют в блокирующем буфере (BB), состоящем из 5% обезжиренного сухого молока (масс.:об.) в фосфатно-солевом буфере плюс 0,05% Tween-20 (PBST) в течение 1 часа при температуре окружающей среды с орбитальным перемешиванием. После промывки мембран в промывочном буфере (WB), состоящем из 3% обезжиренного сухого молока в PBST, мембраны инкубируют с соответствующим раствором первичных антител (разведенным в BB), либо при температуре окружающей среды (1 час), либо при 4°C (в течение ночи) с непрерывным орбитальным перемешиванием. Используют следующие первичные антитела и соотношения разведения: моноклональное антитело мыши против AAV Rep (mAb); 2. антибакуловирусный оболочечный гликопротеин gp64 mAb мыши; анти-OTOF mAb мыши. После инкубации, растворы первичных антител удаляют и мембраны промывают в

WB (3x5 мин). Неконъюгированные mAb инкубируют с раствором вторичных антител (конъюгированное с пероксидазы хрена (HRP) антитело козы против мыши в течение 1 часа, и затем промывают WB, как указано выше. Активность HRP обнаруживают по усиленной хемилюминесценции (ECL).

Липидные наночастицы

кДНК или мРНК отоферлина инкапсулируют в наночастицы поли(молочной-со-гликолевой кислоты) с помощью способа испарения растворителя с двойной эмульсией, описанного ранее (O'Donnell and McGinity 1997 Adv Drug Delivery Rev 28(1):25-42), и в липидные наночастицы (Pezzoli et al. 2013 Methods Mol Biol 1025:269-279). Коротко, твердые липидные наночастицы могут быть получены из микроэмульсии с использованием Precirol ATO-5 и стеариламина в качестве катионного липида. 500 мг Precirol ATO-5 нагревают до температуры на 10°C выше его точки плавления и добавляют 10 мл горячего водного раствора полоксамера и стеариламина в различных соотношениях (1/1,25; 1/1,87; 1/3,12; 1/4,37 и 1/5). Образец перемешивают в течение 30 минут при 14000 об/мин. Наночастицы получают диспергированием горячей микроэмульсии в холодной воде (2-5°C) в соотношении эмульсия:вода 1:5. Для извлечения наночастиц, полученную суспензию трижды центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 минут при температуре 20°C, восстанавливая осадок после центрифугирования. Катионные твердые липидные наночастицы лиофилизируют добавлением водного раствора криопротектора (5% маннита) в соотношении 1:2 (SLN:маннит). Температуру замораживания устанавливают на уровне -40°C в лиофилизаторе, и образцы выдерживают при этой температуре в течение 2 часов. Затем температуру лиофилизации устанавливают на 25°C при давлении 0,2-0,4 мБа в течение 48 часов. Готовят раствор плазмиды кДНК OTOF до концентрации 2 мкг/мкл. Затем аликвоту 25 мкл раствора плазмидной ДНК добавляют к различным объемам катионной суспензии SLN для получения соотношения от 15:1 до 1:1 (SLN:OTOF) путем перемешивания.

Модифицированная РНК

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

Процесс конструирования и синтеза первичных конструкций по настоящему изобретению обычно включает стадии конструирования генов, продуцирования мРНК (с модификациями или без них) и очистки. В способе ферментативного синтеза, полинуклеотидную последовательность-мишень, кодирующую представляющий интерес полипептид, сначала выбирают для включения в вектор, который будут амплифицировать для получения матрицы кДНК. Необязательно, полинуклеотидная последовательность и/или любые фланкирующие последовательности могут быть оптимизированы по кодонам. Затем матрицу кДНК используют для получения мРНК посредством транскрипции in vitro (IVT). После продуцирования, мРНК может подвергаться процессам очистки и очистки. Стадии которых более подробно описаны ниже.

Конструирование гена

Стадия конструирования гена может включать, но не ограничена ими, синтез гена, амплификацию вектора, очистку плазмиды, линеаризацию и очистку плазмиды, и синтез и очистку матрицы кДНК.

Синтез гена

После того, как представляющий интерес полипептид или мишень выбран для продуцирования, конструируется первичная конструкция. В первичной конструкции, первая область связанных нуклеозидов, кодирующая представляющий интерес полипептид, может быть сконструирована с использованием открытой рамки считывания (ORF) транскрипта выбранной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). ORF может содержать ORF дикого типа, ее изоформу, вариант или фрагмент. Используемый в настоящем документе термин «открытая рамка считывания» или «ORF» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которая кодирует представляющий интерес полипептид. ORF часто начинается с инициирующего кодона, ATG, и заканчивается нонсенс-кодоном или сигналом или кодоном или сигналом терминации. Кроме того, нуклеотидная последовательность первой области может быть кодон-оптимизированной. Способы оптимизации кодонов известны в данной области техники и могут быть полезны для достижения одной или нескольких из нескольких целей. Эти цели включают в себя согласование частот кодонов в организмах-мишенях и организмах-хозяевах для обеспечения правильного фолдинга, смещение содержания GC для повышения стабильности мРНК или уменьшения вторичных структур, минимизацию тандемных повторов кодонов или базовых последовательностей, которые могут нарушать построение или экспрессию генов, настройку областей контроля транскрипции и трансляции, вставку или удаление последовательности переноса белка, удаление/добавление сайтов посттрансляционной модификации в кодируемом белке (например, сайтов гликозилирования), добавления, удаления или шафлинга белковых доменов, вставки или удаления сайтов рестрикции, изменения сайтов связывания рибосом и сайтов деградации мРНК, регулировки скорости трансляции чтобы позволить различным доменам белка правильно свернуться или уменьшить или устранить проблемные вторичные структуры в мРНК. Инструменты, алгоритмы и услуги оптимизации кодонов известны в данной области техники. Неограничивающие примеры включают услуги от GeneArt (Life Technologies) и DNA2.0 (Menlo Park Calif.) и/или запатентованные способы. В одном варианте осуществления, последовательность ORF оптимизируется с использованием алгоритмов оптимизации. Варианты кодонов для каждой аминокислоты известны в данной области техники.

Стоп-кодоны

В одном варианте осуществления, первичные конструкции по настоящему изобретению могут включать, по меньшей мере, два стоп-кодона перед 3' нетранслируемой областью (UTR). Стоп-кодон может быть выбран из TGA, TAA и TAG. В одном варианте осуществления, первичные конструкции по настоящему изобретению включают стоп-кодон TGA и один дополнительный стоп-кодон. В другом варианте осуществления, дополнительный стоп-кодон может представлять собой TAA. В другом варианте осуществления, первичные конструкции по настоящему изобретению включают три стоп-кодона.

Амплификация вектора

Затем вектор, содержащий первичную конструкцию, амплифицируют, и плазмиду выделяют и очищают с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь ими, макси-преп с использованием набора Invitrogen PURELINK.TM. HiPure Maxiprep Kit (Carlsbad, Calif.).

Линеаризация плазмиды

Затем плазмиду можно линеаризовать с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь ими, использование рестрикционных ферментов и буферов. Реакция линеаризации может быть очищена с использованием способов, включая, например, набор Invitrogen's PURELINK® PCR Micro Kit (Carlsbad, Calif.), и способов очистки на основе ВЭЖХ, таких как, но не ограничиваясь ими, сильная анионообменная ВЭЖХ, слабая анионообменная ВЭЖХ, обращенно-фазовая ВЭЖХ (RP-HPLC) и ВЭЖХ гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC) и набор Invitrogen's standard PURELINK.TM. PCR Kit (Carlsbad, Calif.). Способ очистки может быть изменен в зависимости от размера проводимой реакции линеаризации. Затем линеаризованную плазмиду используют для создания кДНК для реакций транскрипции in vitro (IVT).

Синтез матрицы кДНК

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

Продуцирование мРНК

Процесс продуцирования мРНК или ммРНК может включать, но не ограничен ими, транскрипцию in vitro, удаление матрицы кДНК и очистку РНК, а также реакции кэпирования и/или образования хвостов мРНК.

Транскрипция in vitro

кДНК, полученная выше, может быть транскрибирована с использованием системы транскрипции in vitro (IVT). Система обычно включает буфер транскрипции, нуклеотид трифосфаты (NTP), ингибитор РНКазы и полимеразу. NTP могут быть изготовлены на месте, могут быть выбраны у поставщика или могут быть синтезированы, как описано в настоящем документе. NTP могут быть выбраны из, но не ограничены ими, описанные в настоящем документе, включая природные и нет природные (модифицированные) NTP. Полимераза может быть выбрана из, но не ограничена ими, T7 РНК полимеразы, T3 РНК полимеразы и мутантных полимераз, таких как, но не ограничиваясь ими, полимеразы, способные включать модифицированные нуклеиновые кислоты.

Кэпирование 5'

Структура 5' кэпа мРНК участвует в ядерном экспорте, увеличивая стабильность мРНК. Он связывает кэп-связывающий белок мРНК (CBP), который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции посредством ассоциации CBP с poly(A) связывающим белком с образованием зрелых видов циклической мРНК. Кроме того, кэп способствует удалению 5' проксимальных интронов во время сплайсинга мРНК. Молекулы эндогенной мРНК могут быть кэпированы на 5' конце, образуя 5'-ppp-5' трифосфатную связь между остатком концевого кэпа гуанозина и 5' концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Затем этот 5' кэп гуанилата может быть метилирован с образованием остатка N7-метилгуанилата. Сахара рибозы концевых и/или антетерминальных транскрибируемых нуклеотидов 5' конца мРНК могут быть необязательно также 2'-O-метилированы. 5' декэпирование посредством гидролиза и расщепления структуры гуанилатного кэпа может таргетировать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, для деградации. Модификации полинуклеотидов, первичных конструкций и ммРНК по настоящему изобретению могут генерировать негидролизуемую кэп-структуру, предотвращающую декэпирование и, таким образом, увеличивающую время полужизни мРНК. Поскольку гидролиз кэп-структуры требует расщепления 5'-ppp-5' фосфодиэфирных связей, во время реакции кэпирования можно использовать модифицированные нуклеотиды. Например, Vaccinia Capping Enzyme from New England Biolabs (Ipswich, Mass.) можно использовать с нуклеотидами альфа-тиогуанозина в соответствии с инструкциями производителя для создания фосфоротиоатной связи в 5'-ppp-5' кэпе. Можно использовать дополнительные модифицированные гуанозиновые нуклеотиды, такие как альфа-метилфосфонатные и селенофосфатные нуклеотиды. Дополнительные модификации включают, но не ограничены ими, 2'-O-метилирование рибозных сахаров 5' концевых и/или 5' антетерминальных нуклеотидов мРНК (как указано выше) по 2'-гидроксильной группе сахарного кольца. Множественные различные структуры 5' кэпа могут быть использованы для создания 5' кэпа молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула мРНК.

Фланкирующие области нетранслируемые области (UTR)

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5'UTR начинается с сайта начала транскрипции и продолжается до инициирующего кодона, но не включает инициирующий кодон, тогда как 3'UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. UTR могут быть включены в полинуклеотиды, первичные конструкции и/или мРНК по настоящему изобретению для повышения стабильности молекулы. UTR также должны быть включены для обеспечения контролируемого подавления транскрипта в случае, если он неправильно направлен в нежелательные участки органов.

5' UTR и инициация трансляции

Путем конструирования признаков, обычно обнаруживаемых в обильно экспрессируемых генах конкретных органов-мишеней, можно повысить стабильность и продуцирование белка полинуклеотидов, первичных конструкций или ммРНК по настоящему изобретению. Например, интроны или части последовательностей интронов могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов, первичных конструкций или ммРНК по изобретению.

Богатые AU элементы

Богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., Mol. Cell. Biol. 15:5777-5788, 1995; Chen et al., Mol. Cell Biol. 15:2010-2018, 1995): ARE класса I содержат несколько диспергированных копий мотива AUUUA в U-богатых областях. C-Myc и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II содержат два или несколько перекрывающихся нонамера UUAUUUA(U/A)(U/A) (SEQ ID NO: 38). Молекулы, содержащие этот тип ARE, включают GM-CSF и TNF-α. ARES класса III менее четко определены. Эти U-богатые области не содержат мотив AUUUA. c-Jun и Myogenin представляют собой два хорошо изученных примера этого класса. Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мессенджер, тогда как члены семейства ELAV, в первую очередь HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование специфических сайтов связывания HuR в 3'UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, к стабилизации сообщения in vivo. Введение, удаление или модификацию 3' UTR AU-богатых элементов (ARE), можно использовать для модулирования стабильности полинуклеотидов, первичных конструкций или ммРНК по изобретению. При конструировании специфических полинуклеотидов, первичных конструкций или ммРНК можно ввести одну или несколько копий ARE, чтобы сделать полинуклеотиды, первичные конструкции или ммРНК по изобретению менее стабильными и, таким образом, ограничить трансляцию и снизить продуцирование полученного белка. Точно так же, ARE можно идентифицировать и удалить или мутировать для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличить трансляцию и продуцирование полученного белка. Эксперименты по трансфекции можно проводить на соответствующих клеточных линиях с использованием полинуклеотидов, первичных конструкций или ммРНК по настоящему изобретению, и продуцирование белка можно анализировать в различные моменты времени после трансфекции. Например, клетки могут быть трансфицированы различными ARE-сконструированными молекулами и с использованием набора ELISA для соответствующего белка и анализа белка, полученного через 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов и 7 дней после трансфекции. Полинуклеотид, первичная конструкция и мРНК по настоящему изобретению могут быть составлены с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые можно использовать для доставки, включают, но не ограничены ими, составы DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif.) от MIRUS® Bio (Madison, Wis) и Roche Madison (Madison, Wis), полимерные составы PHASERX™, такие как, без ограничения, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™ (PHASERX®, Seattle, Wash.), DMRI/DOPE, полоксамер, адъювант VAXFECTIN® от Vical (San Diego, Calif.), хитозан, циклодекстрин от Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif.), дендримеры и полимеры поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (PLGA), полимеры RONDEL™ (доставка наночастиц РНКи/олигонуклеотидов) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, CA) и pH-чувствительные со-блокполимеры, такие как, но не ограничиваясь ими, PHASERF® (Seattle, Wash.). Многие из этих полимерных подходов продемонстрировали эффективность доставки олигонуклеотидов in vivo в цитоплазму клетки (рассмотрено в deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки). Два полимерных подхода, которые обеспечили надежную доставку нуклеиновых кислот in vivo, в настоящем случае с малой интерферирующей РНК (миРНК), представляют собой динамические поликонъюгаты и наночастицы на основе циклодекстрина. Первый из этих подходов к доставке использует динамические поликонъюгаты, и было показано на мышах in vivo, что он эффективно доставляет миРНК и подавляет эндогенную мРНК-мишень в гепатоцитах (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки). Этот конкретный подход представляет собой многокомпонентную полимерную систему, ключевые особенности которой включают мембраноактивный полимер, с которым нуклеиновая кислота, в настоящем случае миРНК, ковалентно связана дисульфидной связью, и где и ПЭГ (для маскировки заряда), и N-ацетилгалактозаминовая (для таргетирования гепатоцитов) группы связаны посредством pH-чувствительных связей (Rozema et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 104:12982-12887; полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки). При связывании с гепатоцитом и проникновении в эндосому, полимерный комплекс разбирается в среде с низким pH, где полимер проявляет свой положительный заряд, что приводит к выходу из эндосомы и цитоплазматическому высвобождению миРНК из полимера. Было показано, что путем замены группы N-ацетилгалактозамина на группу маннозы можно изменить таргетирование с гепатоцитов, экспрессирующих рецептор асиалогликопротеина, на синусоидальный эндотелий и клетки Купфера. Другой полимерный подход включает использование поликатионных наночастиц, содержащих циклодекстрин, таргетируемых трансферрином. Эти наночастицы продемонстрировали, что таргетный сайленсинг генного продукта EWS-FLI1 в опухолевых клетках саркомы Юинга, экспрессирующих рецептор трансферрина (Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 2005 65: 8984-8982; полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки) и миРНК, составленный в этих наночастицах, хорошо переносился приматами, отличными от человека (Heidel et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007 104:5715-21; полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки). Обе эти стратегии доставки включают рациональные подходы, использующие как таргетную доставку, так и механизмы эндосомального ускользания.

Пример 16. Восстановление слуха у мышей Otof $^{-/-}$ методом транс-сплайсинга.

Проводят эксперимент, чтобы определить, можно ли восстановить слух у мышей Otof$^{-/-}$ с использованием комбинации двух разных векторов с использованием способов, описанных в настоящем документе.

Материалы и способы

Клонирование

Вариант 4 транскрипта кДНК отоферлина мыши (KX060996; кодирующая последовательность ДНК (CDS), идентичная эталонной последовательности NM_001313767), который субклонирован из кДНК улитки (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535) субклонируют в остов для продуцирования AAV с использованием стандартных стратегий клонирования, включая рестрикционные перевары и лигирование. Оба вектора содержат ITR серотипа 2. Энхансер CMV и промотор J-актина человека субклонируют в 5’ вектор, который содержит кДНК eGFP и сигнал P2A (фигура 1). CDS отоферлина делят в месте соединения экзон21-экзон22 на две половины примерно одинакового размера. 5’ вектор кодирует N-концевую часть отоферлина от аминокислоты 1 до 844, 3’ вектор содержит кодирующую последовательность для аминокислот 845-1977 и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) и сигналы полиаденилирования.

Для подхода транс-сплайсинга, донорный сайт сплайсинга (Trapani et al. (2014) EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014) следует за кодирующей последовательностью в 5’ векторе. В 3’ векторе акцепторный сайт сплайсинга субклонируют непосредственно перед кодирующей последовательностью отоферлина. В кодирующую последовательность вводят молчащую мутацию, создающую дополнительный сайт для рестрикционного перевара.

Для гибридного подхода, рекомбиногенную область фага F1 для гомологичной рекомбинации субклонируют сразу после донорного сайта сплайсинга в 5’ векторе и перед акцепторным сайтом сплайсинга 3’ вектора (фигура 2). Идентичность плазмид подтверждают секвенированием по Сэнгеру.

Получение и очистка вирусов

Двойные векторы AAV получают путем временной трансфекции клеток HEK293, выращенных на многоуровневых клеточных фабриках. Клетки котрансдуцируют хелперными плазмидами для продуцирования вируса, кодирующего капсидные белки серотипа 6. Очистку клеточных лизатов проводят ультрацентрифугированием в градиенте плотности с йодиксанолом, после чего следует вторая стадия очистки и концентрирования с помощью аффинной хроматографии FPLC (Asai et al. (2015) Nat. Neurosci. 18 1584-1593; Tereshchenko et al. (2014) Neurobiol. Dis. 65 35-42). Для подхода транс-сплайсинга, 5' вектор достигает концентрации ~$2,8\times10^8$ трансдуцирующих единиц/мкл. 3' вектор достигает ~$1,4\times10^8$ трансдуцирующих единиц/мкл. При гибридном подходе, оба вируса очищают одновременно в одних и тех же растворах, достигая несколько более высоких титров вируса.

Штаммы мышей

Мышей с нокаутом ($Otof^{-/-}$) получают, как описано (Reisinger et al. (2011) J. Neurosci. 31 4886-4895), и подвергают обратному скрещиванию в течение, по меньшей мере, 5 поколений либо со штаммами C57/Bl6N, либо со штаммами CD1. Для инъекции вируса используют потомство F1 от самок $Otof^{-/-}$ CD1 и самцов $Otof^{-/-}$ C57/Bl6N. Для контроля дикого типа мышей $Otof^{+/+}$ из разведения $Otof^{+/-}$ C57/Bl6N скрещивают с мышами CD1 дикого типа (Charles River).

Инъекция вируса

Мышей в 6-7 постнатальный день (P6-7) анестезируют с использованием 2,5%-5% изофлурана. Кожу за левым пузырем вскрывают и обнажают нишу круглого окна. Вирусный раствор в стеклянном капилляре вводят через мембрану круглого окна с помощью микроинъектора PLI-100A BASIC PICOLITER (Harvard Apparatus GmbH, Germany) в качестве источника давления, таким образом вводя примерно 0,2-0,5 мкл раствора во внутреннее ухо (Jung et al. (2015) EMBO J. 34 2686-2702). Кожу закрывают, и детенышей выращивают их матери.

Иммуногистохимия

Иммунологическое окрашивание проводят, как описано ранее (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). После декапитации выделяют височные кости, вскрывают часть улиткового костного щитка и перфорируют круглое окно. Височные кости фиксируют в 4% растворе формальдегида в PBS в течение 45 мин при 4°C. Улитки мышей старше P20 декальцинируют либо в течение 5 мин в растворе Морзе, либо в течение 2 дней в 0,12 M растворе ЭДТК. Блокирование проводят с помощью 17% нормальной сыворотки козы, 0,3% Triton X-100, 0,45 мМ NaCl и 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. Антитела разводят в блокирующем растворе и наносят на кортиев орган, расположенный в височных костях, перед иссечением апикального и базального витков. Используют следующие антитела: IgG1 козы анти-Ctbp2 мыши анти-отоферлин (RRID:AB_881807, Abcam, Cambridge, UK, 1:300), анти-отоферлин кролика (Synaptic Systems, Göttingen, Germany, 1:100), анти-кальбиндин D28k козы и вторичные антитела, меченные Alexa Fluor®405, Alexa Fluor®488-, Alexa Fluor®568-, Alexa Fluor®594- и AlexaFluor647 (Invitrogen, 1:200). Изображения конфокальной микроскопии получают в виде последовательных 2D изображений с размером шага 0,6 мкм с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Leica TCS SP5, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) с 63-кратным глицериновым иммерсионным объективом (NA=1,456). Количество синапсов в 14-16-дневных внутренних волосковых клетках (IHC) подсчитывают с использованием плагина счетчика клеток в программном обеспечении ImageJ как количество пятен Ctbp2. Анализ изображений для определения фракционных уровней мембраносвязанного отоферлина описан Strenzke et al. (2016a) EMBO J. 35 2519-2535).

Электрофизиология

Токи Ca^{2+} и емкость плазматической мембраны из IHC измеряют с помощью фиксации потенциалов IHC из апикальных витков свежерассеченных кортиевых органов в конфигурации перфорированного пэтч-клампа при комнатной температуре (20-25°C), как описано (Moser & Beutner (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97 883-888). Раствор пипетки содержит 130 мМ Cs-глюконата, 10 мМ хлорида тетраэтиламмония (TEA-Cl), 10 мМ 4-аминопиридинаа (Merck, Darmstadt, Germany), 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Cs-HEPES (pH 7,17, осмолярность прибл. 290 мОсм), 300 мкг/мл амфотерицина B (Calbiochem, La Jolla, CA). Внеклеточный раствор содержит 110 мМ NaCl, 35 мМ TEA-Cl, 2,8 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Na-HEPES, 1 мМ CsCl, 11,1 мМ D-глюкозы (pH 7,2, осмолярность прибл. 300 мОсм). Если не указано иное, все химикаты получены от Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Усилитель EPC-9 (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany), управляемый программным обеспечением Pulse, используют для отбора и фильтрации токов на частоте 20 кГц и 5 кГц, соответственно. Потенциалы корректируют на диффузный потенциал (-14 мВ). ΔCm измеряют с использованием деполяризации различной продолжительности до пикового потенциала тока Ca^{2+} с интервалами между стимулами 30-60 с, как описано ранее (Beutner & Moser (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97 883-888). Все токи корректируют на утечку с использованием протокола P/6. Скорость пополнения везикул рассчитывают как ΔCm в течение 100 мс деполяризации минус ΔCm при деполяризации 20 мс, деленное на 45 аФ на везикулу (Neef et al. (2007) The Journal of Neuroscience 27 12933-12944), чтобы получить количество везикул. Количество активных зон на клетку определяют с помощью иммуногистохимии (10 синапсов для трансдуцированных $Otof^{-/-}$ IHC, 14 синапсов для $Otof^{+/+}$ IHC).

Записи ABR

Слуховые реакции ствола мозга регистрируют, как описано (Jing et al. (2013) J Neurosci 33 4456-4467).

Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР и секвенирование

Общую РНК выделяют из остро рассеченных кортиевых органов с помощью набора Invitrogen™ TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, 12183555) в соответствии с инструкциями производителя, и используют в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием системы SuperScript® IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific, 18091050) с праймерами $Oligo(dT)_{20}$ и праймерами Random Hexamer. кДНК далее используют в реакциях ПЦР амплификации с использованием полимеразы DreamTaq® (Thermo Fisher Scientific, EP0702) с использованием следующих праймеров:

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

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

C-концевой фрагмент 3’-CTGACCTGCCACCCATCAATGGCCCAGTGG-5' (SEQ ID NO: 27) и 3’-CTATGCGCTCCTCCTCTGTGGAGCCATCCT-5' (SEQ ID NO: 28).

Все полосы вырезают, клонируют в вектор pCR2.1™-TOPO® с использованием набора для клонирования TOPO® TA® (Thermo Fisher Scientific, 450641) и вводят в клетки One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli (Thermo Fisher Scientific, C404050). Все клоны подвергают скринингу на правильную вставку и подтверждают секвенированием по Сэнгеру.

Результаты

Для тестирования подхода транс-сплайсинга создают векторы с двумя AAV, каждый из которых содержит половину CDS отоферлина. В первом векторе, промотор β-актина человека и энхансер CMV используют для управления экспрессией eGFP и 5’ фрагмента отоферлина, разделенных последовательностью P2A (фигура 1). Второй вектор содержит 3’ CDS отоферлина и элементы, стабилизирующие мРНК. Векторы AAV подвергают мультимеризации «голова к хвосту» в ядрах клеток-мишеней путем негомологичного соединения концов инвертированных концевых повторов (ITR), тем самым способствуя сборке двух векторных геномов. Донорный сайт сплайсинга в 5’ векторе и акцепторный сайт сплайсинга в 3’ векторе включают, чтобы ускорить процессинг правильной полноразмерной мРНК отоферлина (фигура 1).

Животным с нокаутом отоферлина $Otof^{-/-}$ на 6-7 день постнатального периода (P6-7) совместно вводят оба AAV (~1,4-2,8×10^8 трансдуцирующих единиц/мкл) через мембрану круглого окна левого уха (фигура 3). Не инъецированные однопометные животные $Otof^{-/-}$ и животные дикого типа, некоторым из которых вводят AAV, кодирующие eGFP, служат в качестве контролей. На P23-28, слух проверяют с использованием слуховых записей ствола мозга (ABR), и скорость трансдукции внутренних волосковых клеток (IHC) и уровни экспрессии отоферлина проверяют с помощью иммуногистохимии. Как показано на фигуре 3, у не трансдуцированных мышей $Otof^{-/-}$, записи ABR вызывают заметный суммирующий потенциал (SP) из-за деполяризации IHC, но эти сигналы не передаются в ствол мозга, что приводит к плоской линии. После двойной трансдукции AAV, у мышей отображаются типовые волны ABR, указывающие на то, что слуховая информация обрабатывается в стволе головного мозга.

В ответ на щелкающие стимулы, пороги в успешно трансдуцированных ушах составляют 54±3 дБ (диапазон: 30-70 дБ). В контрольных экспериментах, у не трансдуцированных однопометных животных $Otof^{-/-}$ не было обнаружено волн ABR, кроме суммирующего потенциала, даже при звуковом стимуле мощностью 100 дБ. Стимулы чистого тона вызывают ответы ABR в большинстве трансдуцированных ушей, но не у не трансдуцированных контрольных однопометников Otof$^{-/-}$ (фигуры 3-6). ABR чистого тона можно обнаружить для низких (6 кГц), средних (12 кГц) и высоких частот (24 кГц). Контроли Otof$^{+/+}$ показывают нормальные формы волны ABR с порогом 39±1 дБ (диапазон: 30-40 дБ) (фигуры 4 и 5). Как показано на фигуре 4, амплитуды волн ABR у трансдуцированных мышей Otof$^{-/-}$ меньше, чем у мышей дикого типа Otof$^{wt/wt}$, трансдуцированных двойным AAV с усиленным зеленым флуоресцентным белком (eGFP).

Для тестирования правильной конкатемеризации и повторной сборки полноразмерной мРНК отоферлина в правильной ориентации, мРНК экстрагируют из кортиевых органов трансдуцированных и не трансдуцированных P14 Otof$^{-/-}$. После обратной транскрипции в кДНК, амплифицируют три фрагмента мРНК отоферлина: один, кодируемый 5' вирусом, один, кодируемый 3' вирусом и один фрагмент, покрывающий сайт сборки двух векторов. Секвенирование по Сэнгеру ПЦР ампликонов выявило правильные транскрипты отоферлина, содержащие молчащую мутацию отоферлина, трансдуцированного вирусом, что указывает на правильную сборку мРНК отоферлина, трансдуцированной двойным AAV.

Для изучения скорости трансдукции внутренних волосковых клеток (IHC) и уровней экспрессии отоферлина, кортиевы органы вырезают у P18-28 и анализируют с помощью иммуногистохимии с использованием двух антител против отоферлина, одно связывается с N-концевой частью, и другое связывается с C-концевой частью отоферлина (фигура 6 и фигура 7). Как показано на фигуре 7, кальбиндин используют в качестве маркера для внутренних и наружных волосковых клеток. Клетки, экспрессирующие eGFP, указывают на вирусную трансдукцию, по меньшей мере, 5' вируса. Окрашивание антителами против отоферлина (Abcam) в N-концевой половине отоферлина указывает на экспрессию N-концевой части отоферлина. Окрашивание C-концевых антител против отоферлина (Synaptic Systems) указывает на экспрессию C-концевой части отоферлина. В совокупности, все три панели на фигуре 7 демонстрируют, что полноразмерный отоферлин экспрессируется в IHC. От двенадцати до пятидесяти одного процента (в среднем 32±4%, с.о.с.) IHC демонстрируют полноразмерную экспрессию отоферлина с более высокой скоростью трансдукции IHC в верхушке улитки (область низких частот, скорость трансдукции 35±5%; диапазон: 19-52%), чем в базальном витке (24±6%, диапазон: 0-51%). Примерно 10% всех IHC показывают сигнал отоферлина на N-конце, но не экспрессию отоферлина на C-конце, что предположительно указывает на трансдукцию только 5' вектора. У контрольных однопометников Otof$^{-/-}$ сигнал не наблюдается. Примечательно, что как N-концевой, так и C-концевой сигнал отоферлина обнаружен только в IHC, тогда как флуоресценция eGFP может быть дополнительно обнаружена в наружных волосковых клетках (OHC), а также в других типах клеток, которые не экспрессируют отоферлин параллельно. Таким образом, несмотря на то, что AAV трансдуцируется в несколько типов клеток кортиева органа, экспрессия отоферлина ограничивается IHC. Для количественной оценки уровней экспрессии отоферлина, измеряют иммунофлуоресценцию с использованием N-концевого антитела против отоферлина в конфокальных пакетах иммуноокрашенных IHC (как в Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Обнаружено, что в $Otof^{-/-}$ IHC, трансдуцированных двойным AAV, уровни отоферлина составляют ~30% от контроля дикого типа.

Поскольку синапсы у мышей $Otof^{-/-}$ частично теряются в течение второй постнатальной недели, проводят эксперимент, чтобы определить, влияет ли экспрессия отоферлина в этих IHC на количество синапсов. Синаптические ленты являются иммуномеченными; 9±0,3 синапсов обнаружено в 26-дневных не трансдуцированных $Otof^{-/-}$ IHC (n=42 клетки, N=3 животных). В $Otof^{-/-}$, трансдуцированном двойным AAV, 10±0,2 синапсов идентифицируют с помощью флуоресценции eGFP (n=59 клеток; N=3 животных). Напротив, IHC дикого типа демонстрируют 13-16 синапсов на IHC (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Таким образом, экспрессия отоферлина после двойной инъекции AAV на P6 частично предотвращает потерю синапсов из P26 $Otof^{-/-}$ IHC.

Данные на фигурах 15 и 16 также показывают, что гибридный подход (введение векторов, показанных на фигуре 2) также восстанавливает активность отоферлина в IHC мышей $Otof^{-/-}$.

Эти данные указывают на то, что заявляемые способы могут восстановить слух у млекопитающих, имеющих инактивирующую мутацию в гене отоферлина.

Пример 17: Восстановление экзоцитоза в ответ на короткие стимулы деполяризации, восстановленные с помощью транс-сплайсинга, опосредованной двойным AAV экспрессии отоферлина в IHC мышей $Otof^{-/-}$.

Проводят эксперимент, чтобы определить, восстанавливают ли заявленные в настоящем документе способы слияние синаптических везикул с внутренними слуховыми волосковыми клетками у мышей $Otof^{-/-}$.

Поскольку слияние синаптических везикул увеличивает поверхность плазматической мембраны клетки, это слияние можно измерить как увеличение емкости плазматической мембраны (ΔCm). Чтобы количественно оценить экзоцитоз легко отделяемого пула везикул и устойчивый экзоцитоз, измеряют изменение емкости плазматической мембраны (ΔC_m) в перфорированной конфигурации пэтч-клампа (фигуры 8-10). Экзоцитоз регистрируют как изменение емкости мембраны после деполяризации IHC до -14 мВ в течение указанного времени.

IHC из остро эксплантированных кортиевых органов мышей деполяризуют в постнатальные дни 14-18 (P14-P18) до напряжения, при котором выявляют максимальные токи Ca^{2+}, обычно -14 мВ. Регистрируют токи Ca^{2+} и ΔC_m от $Otof^{-/-}$ IHC с и без вирусной трансдукции, где трансдуцированные вирусом IHC идентифицируют по их флуоресценции eGFP во время эксперимента. В соответствии с количеством синапсов в необработанных и трансдуцированных $Otof^{-/-}$ IHC, обнаружено, что токи Ca^{2+} сопоставимы по размеру с таковыми у $Otof^{+/+}$ соответствующих по возрасту и фону контроля (фигуры 8 и 10). Как показано на фигуре 8, токи Ca^{2+} не отличаются по амплитуде или свойствам селектора между не трансдуцированными $Otof^{-/-}$ IHC, трансдуцированными двойным AAV

IHC или IHC дикого типа от контрольных животных, соответствующих по фону. В ответ на импульсы деполяризации длительностью 5 или 10 мс, экзоцитоз в трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC оказался такого же размера, как и в Otof$^{+/+}$ IHC, в то время как в не трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC практически не было обнаружено изменений C_m (фигура 9). В самом деле, для коротких стимулов деполяризации до 20 мс экзоцитоз имеет дикий тип, как у трансдуцированных двумя AAV IHC мышей Otof$^{-/-}$, что указывает на интактный, легко высвобождаемый пул везикул. Во время устойчивой деполяризации, везикулы легко высвобождаемого пула нуждаются в пополнении; известно, что для этого процесса необходим отоферлин (Pangrsic et al. (2010) Nat. Neurosci. 13 869-876; Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Для более длительных стимулов деполяризации, экзоцитоз имеет диапазон мышей Otof$^{I515T/I515T}$ с легким ухудшением слуха (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Как показано на фигуре 9, для деполяризации в течение 50-100 мс экзоцитоз в трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC составляет ~60% от Otof$^{+/+}$ IHC, в то время как в не трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC практически не наблюдается слияния везикул, как описано ранее (Roux et al. (2006) Cell 127 277-289). Скорость пополнения везикул рассчитывают в отдельных трансдуцированных клетках. Было обнаружено, что примерно 380 везикул/сек/активную зону подвергаются экзоцитозу по сравнению с 750 везикул/сек/активную зону в Otof$^{+/+}$ IHC (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Таким образом, в трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC скорость пополнения везикул RRP может быть частично восстановлена и находится между таковой у контрольных мышей дикого типа и мышей Otof$^{I515T/I515T}$ с легким ухудшением слуха (Strenzke et al. (2016) EMBO J. 35 2519-2535). Как показано на фигуре 10, интегралы Ca^{2+} во время стадии деполяризации указывают на то, что аналогичный заряд Ca^{2+} поступает в IHC в трансдуцированных и не трансдуцированных Otof$^{-/-}$ IHC и в контрольных клетках дикого типа.

Выбирают серотип 6 AAV, что приводит к скорости трансдукции IHC до 51%. Искусственный серотип Anc80L65 может, как недавно было показано (Landegger et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35 280-284), еще больше увеличить скорость трансдукции IHC, особенно при применении к более зрелым ушам (Suzuki et al. (2017) Scientific Reports 7 45524).

В целом, эти данные показывают, что слух восстановлен у девяти животных, которым вводят Otof$^{-/-}$, с использованием описанных в настоящем документе способов. Эти данные также указывают на то, что пороги слышимости улучшаются, чем больше IHC экспрессируют отоферлин.

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

По меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот (например, векторы AAV) можно использовать для воссоздания активного гена отоферлина (например, полноразмерного гена отоферлина) внутри клетки после межмолекулярной конкатамеризации и транс-сплайсинга. См., например, Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:12; 6716-6721, 2000, полностью включенную в настоящий документ.

В некоторых примерах используют два разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может включать промотор (например, любой из промоторов, описанных в настоящем документе), первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3’ конце промотора (например, любой из размеров части белка отоферлина, описанного в настоящем документе, и/или любую из N-концевых частей белка отоферлина, описанного в настоящем документе), и сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце первой кодирующей последовательности. Второй вектор нуклеиновой кислоты может включать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует C-концевую часть белка отоферлина (т.е. всю часть белка отоферлина, которая не включена в N-концевую часть), расположенную на 3’ конце сигнальной последовательности акцептора сплайсинга (например, любой из размеров части белка отоферлина, описанного в настоящем документе, и/или любой из C-концевых частей белка отоферлина, описанного в настоящем документе), и последовательность полиаденилирования на 3’ конце второй кодирующей последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе последовательностей полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления, каждая из кодируемых частей имеет длину, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков (например, по меньшей мере, 50 аминокислот, по меньшей мере, 75 аминокислот или, по меньшей мере, 100 аминокислот), аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей не перекрывается с последовательностью другой кодируемой части, и ни один вектор из двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Когда две кодирующие последовательности двух векторов экспрессируются в клетке млекопитающего (например, в любой из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих), происходит сплайсинг между сигнальной последовательностью донора сплайсинга и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга, в результате чего образуется рекомбинированная мРНК, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В другом примере можно использовать три разных вектора нуклеиновой кислоты. Первый вектор нуклеиновой кислоты может включать часть промоторной последовательности (например, любую из промоторных последовательностей, описанных в настоящем документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из кодирующих последовательностей отоферлина, описанных в настоящем документе), расположенную на 3’ конце промотора, и первую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце первой кодирующей последовательности. Второй вектор нуклеиновой кислоты может включать первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце второй кодирующей последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе сигналов донора сплайсинга). Отличительной особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (т.е. не будет происходить сплайсинг между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления, первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты различны (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты будет включать вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует третью часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце второй сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, и последовательность полиаденилирования, расположенную на 3’ конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе последовательностей полиаденилирования). В таких способах, где используют три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе, и вторая последовательность донора сплайсинга и вторая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинироваться), и части белка отоферлина соответственно, кодируемые первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрываются, и при введении в клетку млекопитающего (например, любую из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих) происходит сплайсинг между первой последовательностью донора сплайсинга и первой последовательностью акцептора сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга с образованием сплайсированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Основываясь на представленных выше стратегиях, специалист в данной области техники поймет, как разработать стратегию с использованием четырех, пяти или шести различных векторов нуклеиновых кислот.

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

Каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует разные части белка отоферлина, каждая из кодируемых частей может состоять, по меньшей мере, из 30 аминокислот (например, от примерно 30 аминокислот до примерно 1600 аминокислот или любой других поддиапазонов этого диапазона, описанных в настоящем документе).

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

Каждый из, по меньшей мере, двух векторов нуклеиновой кислоты может дополнительно включать инвертированный концевой повтор (ITR), чтобы обеспечить рекомбинацию «голова-хвост». ITR впоследствии будет удален путем сплайсинга. Например, ITR может быть палиндромным двойным D ITR, как описано в Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(12):6716-6721, 2000, полностью включенной в настоящем описании. Например, ITR может представлять собой AAV ITR серотипа-2, как описано в Gosh et al., Mol. Ther. 16:124-130, 2008 и Gosh et al., Human Gene Ther. 22: 77-83, 2011. В данной области техники известны неограничивающие примеры сплайсинга акцепторных и/или донорных сигнальных последовательностей. См., например, Reich et al., Human Gene Ther. 14(1):37-44, 2003 и Lai et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23(11):1435-1439, 2005, 2005. Сигнальные последовательности донора и акцептора сплайсинга могут представлять собой любой сигнал сплайсинга эндогенного интрона гена (например, гена отоферлина).

Например, сигнальная последовательность донора сплайсинга может быть:

5'-GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGG CTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT-3' (SEQ ID NO: 64),

и акцепторный сигнал сплайсинга может быть:

5'-ATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG-3'

(SEQ ID NO: 110) (см., например, Trapani et al., EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014).

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

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

По меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять или шесть) разных векторов нуклеиновых кислот (например, векторы AAV) также можно использовать в любом из способов, описанных в настоящем документе, для воссоздания активного гена отоферлина (например, полноразмерного гена отоферлина) внутри клетки после межмолекулярной конкатамеризации, опосредованной маркерным геном рекомбинации и транс-сплайсинга. Эта стратегия является гибридной стратегией, поскольку она будет включать гомологичную рекомбинацию и/или транс-сплайсинг. См., например, Gosh et al., Mol. Ther. 16: 124-130, 2008; Gosh et al., Human Gene Ther. 22: 77-83, 2011; и Duan et al., Mol. Ther. 4: 383-391, 2001, каждая из которых полностью включена в настоящий документ. Используемый в настоящем документе обнаруживаемый маркерный ген может представлять собой высоко рекомбиногенную последовательность ДНК, которая позволит проводить независимую от кодирующей последовательности рекомбинацию. Неограничивающим примером обнаруживаемого маркерного гена является ген щелочной фосфатазы (AP). Например, обнаруживаемый маркерный ген может представлять собой среднюю треть комплементарной ДНК плацентарного AP человека, длина которой составляет 872 т.н. (см., например, Gosh et al., 2008). По меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот будут содержать обнаруживаемый маркерный ген (например, любой из обнаруживаемых маркерных генов, описанных в настоящем документе). Поскольку гибридный вектор будет сконструирован на основе транс-сплайсингового вектора, как описано в примере 18, активный ген отоферлина (например, полноразмерный ген отоферлина) может быть воссоздан с использованием либо ITR-опосредованной рекомбинации и транс-сплайсинга, либо опосредованной обнаруживаемым маркерным геном (например, опосредованной AP-геном) рекомбинации и транс-сплайсинга. После транс-сплайсинга, активный ген отоферлина (например, полноразмерный ген отоферлина) будет воссоздан в геномной ДНК клетки млекопитающего (например, любой клетки млекопитающего, описанной в настоящем документе).

В одном примере будут использованы два разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может включать промотор (например, любой из промоторов, описанных в настоящем документе), первую кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка отоферлина, расположенную в 3’ конце промотора (например, любого из размеров части белка отоферлина, описанного в настоящем документе, и/или любую из N-концевых частей белка отоферлина, описанного в настоящем документе), сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце первой кодирующей последовательности, и первый обнаруживаемый маркерный ген, расположенный на 3’ конце от сигнальной последовательности донора сплайсинга. Второй вектор нуклеиновой кислоты может включать второй обнаруживаемый маркерный ген, сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3’ конце второго обнаруживаемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце сигнальную последовательность акцептора сплайсинга (например, любого из размеров части белка отоферлина, описанного в настоящем документе, и/или любой из С-концевых частей белка отоферлина, описанного в настоящем документе), и последовательность полиаденилирования на 3’ конце второй кодирующей последовательности (например, любую из описанных в настоящем документе последовательностей полиаденилирования). В некоторых вариантах осуществления, каждая из кодируемых частей имеет длину, по меньшей мере, 30 аминокислотных остатков (например, по меньшей мере, 50 аминокислот, по меньшей мере, 75 аминокислот или, по меньшей мере, 100 аминокислот), аминокислотная последовательность каждой из кодируемых частей не перекрывается, и ни один вектор из двух разных векторов не кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). При введении в клетку млекопитающего (например, любую из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих) происходит сплайсинг между сигнальной последовательностью донора сплайсинга и сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга, в результате чего образуется РНК кислота, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин).

В другом примере можно использовать три разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может включать часть промоторной последовательности (например, любую из промоторных последовательностей, описанных в настоящем документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из последовательностей, кодирующих отоферлин, описанных в настоящем документе), расположенную на 3’ конце промотора, первую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце первой кодирующей последовательности, и первый обнаруживаемый маркерный ген. Второй вектор нуклеиновой кислоты может включать второй поддающийся обнаружению маркерный ген, первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' конце второго обнаруживаемого маркерного гена, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3' конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3’ конце второй кодирующей последовательности (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в настоящем документе), и третий обнаруживаемый маркерный ген. Отличительной особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (т.е. не будет происходить сплайсинг между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления, первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются разными (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты может включать четвертый обнаруживаемый маркерный ген, вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3’ конце четвертого обнаруживаемого маркерного гена, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует третью часть белка отоферлина, расположенного на 3’ конце второй сигнальной последовательности акцептора сплайсинга и последовательности полиаденилирования, расположенной на 3’ конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе последовательностей полиаденилирования). В таких способах, где используют три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинироваться), и вторая последовательность донора слайсинга и вторая последовательность акцептора слайсинга могут собираться вместе (рекомбинироваться), и часть белка отоферлина, кодируемого первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрываются, и при введении в клетку млекопитающего (например, в любую из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих) происходит сплайсинг между первой донорной последовательностью сплайсинга и первой акцепторной последовательностью сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга, с образованием рекомбинированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Как можно понять в данной области техники, при использовании трех векторов нуклеиновых кислот два из, по меньшей мере, двух разных векторов нуклеиновых кислот могут включать обнаруживаемый маркерный ген (например, маркерный ген AP) и один из, по меньшей мере, двух разных векторов нуклеиновых кислот могут включать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, комплементарную сигнальной последовательности донора сплайсинга в векторе нуклеиновой кислоты, который включает обнаруживаемый маркерный ген. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и второй векторы нуклеиновой кислоты могут включать обнаруживаемый маркерный ген (например, маркерный ген AP), и третий вектор нуклеиновой кислоты будет включать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, комплементарную сигнальной последовательности донора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и третий вектор нуклеиновой кислоты не будет включать обнаруживаемый маркерный ген (например, маркерный ген AP). В других примерах, второй и третий вектор нуклеиновой кислоты могут включать обнаруживаемый маркерный ген (например, маркерный ген AP), и первый вектор нуклеиновой кислоты будет включать сигнальную последовательность донора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности акцептора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и первый вектор нуклеиновой кислоты не будет включать обнаруживаемый маркерный ген (например, маркерный ген AP).

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

Кодирующие последовательности, содержащиеся, по меньшей мере, в двух векторах нуклеиновых кислот (например, двух, трех, четырех, пяти или шести), не будут перекрываться. Каждый из, по меньшей мере, двух разных векторов может включать кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, где каждая из кодируемых частей включает, например, по меньшей мере, 30 аминокислот (например, от примерно 30 до примерно 1600 аминокислот, или любой из других поддиапазонов этого диапазона, описанных в настоящем документе).

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

Как описано в примере 18, каждый из, по меньшей мере, двух векторов нуклеиновой кислоты может дополнительно включать инвертированный концевой повтор (ITR), чтобы обеспечить рекомбинацию «голова-хвост». ITR впоследствии будет удален путем сплайсинга. Примеры ITR и сигнальных последовательностей акцептора и/или донора сплайсинга известны в данной области техники и описаны в примере 18.

Пример 20: Стратегия транс-сплайсинга гибридного вектора с использованием фага F1 высоко рекомбиногенной области экзогенного гена (AK)

По меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять или шесть) разных векторов нуклеиновых кислот (например, векторы AAV) также можно использовать в любом из способов, описанных в настоящем документе, для воссоздания активного гена отоферлина (например, полноразмерного гена отоферлина) внутри клетки после межмолекулярной конкатамеризации, опосредованной маркерным геном рекомбинации и транс-сплайсинга. См., например, векторы, показанные на фигуре 2. Эта стратегия является гибридной стратегией, поскольку она будет включать гомологичную рекомбинацию и/или транс-сплайсинг. См., например, Trapani et al., EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014, полностью включенную в настоящий документ. Используемая в настоящем документе рекомбиногенная область фага F1 (AK) будет использоваться для обеспечения возможности независимой от кодирующей последовательности рекомбинации. Рекомбиногенная область фага F1 может представлять собой рекомбиногенную область размером 77 т.н. из генома фага F1, как описано в Trapani et al. (2014) EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014. По меньшей мере, два разных вектора нуклеиновых кислот будут содержать рекомбиногенную область фага F1. Поскольку гибридный вектор будет сконструирован на основе транс-сплайсингового вектора, как описано в примере 18, нуклеиновая кислота, кодирующая активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок стереоцилин), может быть получена с использованием либо ITR-опосредованной рекомбинации и транс-сплайсинга, либо рекомбиногенной области фага F1, индуцированной рекомбинацией и транс-сплайсингом. После транс-сплайсинга, нуклеиновая кислота, кодирующая активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин), будет создаваться в клетке млекопитающего (например, в любой из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих).

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

В другом примере, будут использованы три разных вектора нуклеиновых кислот. Первый вектор нуклеиновой кислоты может включать часть промоторной последовательности (например, любую из промоторных последовательностей, описанных в настоящем документе), первую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует первую часть белка отоферлина (например, любую из последовательностей, кодирующих отоферлин, описанных в настоящем документе), расположенную на 5' конце промотора, первой сигнальной последовательности донора сплайсинга, расположенной на 3' конце первой кодирующей последовательности, и рекомбиногенную область фага F1. Второй вектор нуклеиновой кислоты может включать рекомбиногенную область фага F1, первую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' конце рекомбиногенной области фага F1, вторую кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует вторую часть белка отоферлина, расположенную на 3' конце первой сигнальной последовательности акцептора сплайсинга, вторую сигнальную последовательность донора сплайсинга, расположенную на 3' конце второй кодирующей последовательности (например, любого из сигналов донора сплайсинга, описанных в настоящем документе), и рекомбиногенной области фага F1. Отличительной особенностью второго вектора нуклеиновой кислоты будет то, что самосплайсинг не может происходить (т.е. не будет происходить сплайсинг между второй сигнальной последовательностью донора сплайсинга и первой сигнальной последовательностью акцептора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и второй сигнал донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты являются одинаковыми (например, любой из сигналов донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления, первая сигнальная последовательность донора сплайсинга первого вектора нуклеиновой кислоты и вторая сигнальная последовательность донора сплайсинга второго вектора нуклеиновой кислоты различны (например, любая из сигнальных последовательностей донора сплайсинга, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники). Третий вектор нуклеиновой кислоты может включать рекомбиногенную область фага F1, вторую сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, расположенную на 3' конце рекомбиногенной области фага F1, третью кодирующую последовательность гена отоферлина, которая кодирует третью часть белка отоферлина, расположенную на 3’ конце второй сигнальной последовательности акцептора сплайсинга и последовательность полиаденилирования, расположенной на 3’ конце третьей кодирующей последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе последовательностей полиаденилирования). В таких способах, где используют три вектора нуклеиновых кислот, первая последовательность донора сплайсинга и первая последовательность акцептора сплайсинга могут собираться вместе (рекомбинироваться), и вторая последовательность донора слайсинга и вторая последовательность акцептора слайсинга могут собираться вместе (рекомбинироваться), и часть белка отоферлина, кодируемого первой, второй и третьей кодирующими последовательностями, не перекрываются, и при введении в клетку млекопитающего (например, в любую из описанных в настоящем документе клеток млекопитающих) происходит сплайсинг между первой донорной последовательностью сплайсинга и первой акцепторной последовательностью сплайсинга, и между второй последовательностью донора сплайсинга и второй последовательностью акцептора сплайсинга с образованием рекомбинированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный белок отоферлин (например, полноразмерный белок отоферлин). Как можно понять в данной области техники, когда используют три вектора нуклеиновой кислоты, два из разных векторов нуклеиновой кислоты могут включать рекомбиногенную область фага F1, и один из разных векторов нуклеиновой кислоты может включать сигнальную последовательность акцептора сплайсинга, которая комплементарна сигнальной последовательности донора сплайсинга в векторе нуклеиновой кислоты, который включает рекомбиногенную область фага F1. Например, в некоторых вариантах осуществления, первый и второй векторы нуклеиновой кислоты могут включать рекомбиногенную область фага F1, и третий вектор нуклеиновой кислоты будет включать сигнал акцептора сплайсинга, комплементарный сигнальной последовательности донора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и третий вектор нуклеиновой кислоты не будет включать рекомбиногенную область фага F1 (например, маркерный ген AP). В других примерах, второй и третий вектор нуклеиновой кислоты могут включать рекомбиногенную область фага F1, и первый вектор нуклеиновой кислоты будет включать сигнальную последовательность донора сплайсинга, комплементарную сигнальной последовательности акцептора сплайсинга во втором векторе нуклеиновой кислоты, и первый вектор нуклеиновой кислоты не будет включать рекомбиногенную область фага F1. На основе представленных выше стратегий, специалисту в данной области техники будет понятно, как разработать стратегию с использованием четырех, пяти или шести векторов.

Кодирующие последовательности, представленные в каждом из, по меньшей мере, двух векторов нуклеиновой кислоты (например, двух, трех, четырех, пяти или шести), не будут перекрываться. Каждый из, по меньшей мере, двух различных векторов включает кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть белка отоферлина, где каждая из кодируемых частей представляет собой, по меньшей мере, 30 аминокислот (например, от примерно 30 до примерно 1600 аминокислот, или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанных в настоящем документе).

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

Как описано в примере 18, каждый из, по меньшей мере, двух векторов нуклеиновой кислоты может дополнительно включать инвертированный концевой повтор (ITR), чтобы обеспечить рекомбинацию «голова-хвост». ITR впоследствии будет удален путем сплайсинга. Примеры ITR и сигналов акцептора и/или донора сплайсинга известны в данной области техники и описаны в примере 18.

Эти способы используют для улучшения слуха у пяти животных. Данные на фигуре 15 и 16 показывают, что у мышей Otof$^{-/-}$, которым вводят векторы, показанные на фигуре 2, восстанавливается функция отоферлина в IHC мышей Otof$^{-/-}$.

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

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

Пары этих векторов используют для трансфекции клеток HEK293FT. В этих экспериментах, $1{,}2x10^5$ клеток/лунку высевают в 24-луночный планшет в течение ночи при 37°C с 5% CO_2. На следующий день, пары линеаризованных ITR-содержащих плазмид (пары, показанные на фигуре 49) трансфицируют в клетки HEK293FT с использованием реактива JetPrime (Polyplus). Через семьдесят два часа после трансфекции, клетки собирают и лизируют с использованием буфера RIPA и анализируют в геле с 4-12% белка Bolt. Гель переносят на нитроцеллюлозную мембрану и блоттируют анти-OTOF поликлональными антителами (Thermo PA5-52935). Моноклональное антитело против бета-актина человека используют в качестве основного антитела для контроля внутренней загрузки между треками. Проводят три независимых эксперимента in vitro для анализа и сравнения экспрессии полноразмерного белка с использованием различных стратегий рекомбинации относительно трансфекции одной плазмидой CMV.fl-OTOF (трек 10).

По сравнению с отрицательным контролем, экспрессия полноразмерного белка отоферлина (примерно 226 кДа) наблюдается на каждом треке, кроме трека № 6 (фигуры 50 и 51).

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

Проводят ряд экспериментов, чтобы определить, может ли функция слуха восстановиться у мышей Otof$^{-/-}$, имеющих два вектора (p109 и p105; SEQ ID NO: 84 и 85, соответственно) введенные в их улитку. Коротко, вирусный препарат (например, $1\text{-}2\times10^{10}$ вг/мкл) вводят через слуховой пузырь, покрывающий мембрану круглого окна (RWM), в барабанную лестницу левой улитки примерно на 6-7 день постнатального периода (P6-7). См., например, Jung et al. (2015) EMBO J 34: 2686-2702, и Al-Moyed et al. (2019) EMBO Molecular Medicine 11(1). pii: e9396. Перед инъекцией всех мышей анестезируют изофлураном и местно анестезируют, например, с помощью спрея с ксилокаином, перед ретроаурикулярным разрезом.

Слуховые ответы ствола мозга (ABR) регистрируют у анестезированных мышей в возрасте примерно 3-4 недель, подвергнутых вспышкам тона 4, 6, 8, 12, 16, 24 или 32 кГц (например, 10 мс плато, 1 мс $\cos^2$ нарастание/убывание или широкополосный щелчок длительностью 0,03 мс, предъявляемый с частотой 20 Гц. См., например, Jing et al. (2013) J Neurosci 33: 4456-4467. Инъецированные уши закупоривают электродным гелем, пока

ABR записывают из контралатеральных не инъецированных ушей.

Пороги звука щелчка ABR определяют как самые низкие уровни звукового давления, необходимые для того, чтобы вызвать воспроизводимую реакцию волны ABR, и измеряют с шагом в 10 децибел уровней звукового давления (дБ SPL) от 30 дБ SPL до 100 дБ SPL. Пороги тональных посылок записывают с шагом 10 дБ SPL от 10 дБ SPL ниже самого низкого воспроизводимого ABR и до 90 дБ SPL. Волну I ABR определяют как первый различимый пик между суммирующим рецепторным потенциалом (SP) и заметным пиком волны II ABR. Амплитуду каждой волны ABR рассчитывают как разницу между наивысшей точкой волны и последующим локальным минимумом. Суммарную амплитуда волны I-V ABR рассчитывают путем сложения индивидуальных значений амплитуд волн I-V ABR.

Порог щелчка ABR и порог импульса тона ABR определяют у мышей дикого типа, которых не лечили, мышей $Otof^{-/-}$, которых не лечили, и мышей $Otof^{-/-}$, которых лечили двумя векторами (p109 и p105). Слуховую функцию тестируют у леченных $Otof^{-/-}$ на 26-28 и 91 день после введения. Данные показывают, что мыши $Otof^{-/-}$ демонстрируют значительное улучшение функции слуха после обработки двумя векторами по сравнению с нелечеными мышами $Otof^{-/-}$ (Фигуры 51 и 52).

Пример 23: Восстановление функции слуха in vivo у людей с использованием двух векторов

Проводят ряд экспериментов, чтобы определить, может ли функция слуха восстановиться у людей, которым в улитку введены два вектора (p109 и p105; SEQ ID NO: 84 и 85, соответственно). Функцию слуха тестируют у человека через 15, 30, 45, 60 и 90 дней после введения и сравнивают с функциональным слухом человека, который не подвергался лечению.

Пример 24: Экспрессия in vitro полноразмерного отоферлина человека с использованием двух векторов

Как и в других двухвекторных подходах, два трансгена, каждый из которых содержит часть полноразмерного транскрипта, упаковывают в отдельные векторы и предоставляют вместе для контакта с мишенью, например, с популяцией клеток-мишеней, например, у нуждающегося в этом субъекта. В настоящем примере представлен набор векторов, каждый из которых включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит часть кодирующей последовательности гена отоферлина человека (OTOF) или кДНК OTOF. Общая структура и компоненты «вышестоящего» вектора AKhOTOF5 показаны на фигуре 79. Полная последовательность 5'ITR-3'ITR представлена SEQ ID NO: 96. Последовательности отдельных компонентов в том порядке, в котором они найдены в 5'ITR-3'ITR, представлены в таблице 1 ниже. Общая структура и компоненты «нижестоящего» вектора AKhOTOF3 показаны на фигуре 80. Полная последовательность 5'ITR-3'ITR представлена SEQ ID NO: 105. Последовательности отдельных компонентов в том порядке, в котором они найдены в 5'ITR-3'ITR, представлены в таблице 2 ниже. Схема двойной векторной системы AAV показана на фигуре 78. Капсид Anc80 (SEQ ID NO: 109; см. таблицу 3 ниже) независимо инкапсулирует вышестоящий вектор (Anc80.AKhOTOF5) и нижестоящий вектор (Anc80.AKhOTOF3). В некоторых вариантах осуществления, когда каждый из вышестоящих и нижестоящих векторов вводят субъекту, нуждающемуся в этом, конструкции конкатемеризуются в данной клетке. В некоторых таких вариантах осуществления, конкатемеризованный полноразмерный OTOF экспрессируется и генерирует функциональный белок отоферлин.

Пары этих векторов используют для лечения человека, страдающего или предрасположенного к потере слуха. Композицию, содержащую оба вектора двойной векторной системы AAV, Anc80.AKhOTOF5 и Anc80.AKhOTOF3, вводят, по меньшей мере, в одну улитку человека. Функцию слуха тестируют у человека через 15, 30, 45, 60 и 90 дней после введения и сравнивают с функциональным слухом человека до лечения или с человеком, который не получал лечения.

AKhOTOF5

Конструкция AKhOTOF5 содержит два ITR (SEQ ID NO: 97 и 104), промотор CAG (идентифицированный SEQ ID NO: 98, 99 и 100, содержащий ранний энхансерный элемент CMV, последовательность гена бета-актина цыпленка и химерный интрон содержащий 3’ последовательность сплайсинга из гена бета-глобина кролика, соответственно), кодирующую область 5’ OTOF (SEQ ID NO: 101), последовательность интрона SD (SEQ ID NO: 102) и рекомбиногенную последовательность AK (SEQ ID NO: 103). Полноразмерный AkhOTOF5 представлен SEQ ID NO: 96.

Таблица 1. AKhOTOF5

Наименование	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
AKhOTOF5	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTCGACGCGGC CGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAG TTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT GACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA CGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA	96

	TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGA GCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCC CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGT GCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGA GGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCG GCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGC TGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCG CGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCAC AGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGC TGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTG CGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT GCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGG CTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTC CGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCC CGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGT GCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGG CGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCC CCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTC CGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCG CCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGC CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGC AGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGG GACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGG GAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAA GCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG GCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTC CAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGG GGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG ACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCT TCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATT GTGACCGGTGCCACCATGGCCTTGCTCATCCACCTCAAGA	

	CAGTCTCGGAGCTGCGGGGCAGGGGCGACCGGATCGCCA AAGTGACTTTCCGAGGGCAATCCTTCTACTCTCGGGTCCT GGAGAACTGTGAGGATGTGGCTGACTTTGATGAGACATTT CGGTGGCCGGTGGCCAGCAGCATCGACAGAAATGAGATG CTGGAGATTCAGGTTTTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGCA ACAAGCTCATCGGGACCTTCCGCATGGTGCTGCAGAAGGT GGTAGAGGAGAGCCATGTGGAGGTGACTGACACGCTGAT TGATGACAACAATGCTATCATCAAGACCAGCCTGTGCGTG GAGGTCCGGTATCAGGCCACTGACGGCACAGTGGGCTCCT GGGACGATGGGGACTTCCTGGGAGATGAGTCTCTTCAAG AGGAAGAGAAGGACAGCCAAGAGACGGATGGACTGCTCC CAGGCTCCCGGCCCAGCTCCCGGCCCCCAGGAGAGAAGA GCTTCCGGAGAGCCGGGAGGAGCGTGTTCTCCGCCATGA AGCTCGGCAAAAACAGGTCTCACAAGGAGGAGCCCCAAA GACCAGATGAACCGGCGGTGCTGGAGATGGAAGACCTTG ACCATCTGGCCATTCGGCTAGGAGATGGACTGGATCCCGA CTCGGTGTCTCTAGCCTCAGTCACAGCTCTCACCACTAAT GTCTCCAACAAGCGATCTAAGCCAGACATTAAGATGGAG CCAAGTGCTGGGCGGCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCA CGGTGATCGAGGCCCGGCAGCTGGTGGGCTTGAACATGG ACCCTGTGGTGTGCGTGGAGGTGGGTGACGACAAGAAGT ACACATCCATGAAGGAGTCCACTAACTGCCCCTATTACAA CGAGTACTTCGTCTTCGACTTCCATGTCTCTCCGGATGTCA TGTTTGACAAGATCATCAAGATTTCGGTGATTCACTCCAA GAACCTGCTGCGCAGTGGCACCCTGGTGGGCTCCTTCAAA ATGGACGTGGGAACCGTGTACTCGCAGCCAGAGCACCAG TTCCATCACAAGTGGGCCATCCTGTCTGACCCCGATGACA TCTCCTCGGGGCTGAAGGGCTACGTGAAGTGTGACGTTGC CGTGGTGGGCAAAGGGGACAACATCAAGACGCCCCACAA GGCCAATGAGACCGACGAAGATGACATTGAGGGGAACTT GCTGCTCCCCGAGGGGGTGCCCCCCGAACGCCAGTGGGC CCGGTTCTATGTGAAAATTTACCGAGCAGAGGGGCTGCCC CGTATGAACACAAGCCTCATGGCCAATGTAAAGAAGGCT TTCATCGGTGAAAACAAGGACCTCGTGGACCCCTACGTGC AAGTCTTCTTTGCTGGCCAGAAGGGCAAGACTTCAGTGCA	

	GAAGAGCAGCTATGAGCCCCTGTGGAATGAGCAGGTCGT	
	CTTTACAGACCTCTTCCCCCCACTCTGCAAACGCATGAAG	
	GTGCAGATCCGAGACTCGGACAAGGTCAACGACGTGGCC	
	ATCGGCACCCACTTCATTGACCTGCGCAAGATTTCTAATG	
	ACGGAGACAAAGGCTTCCTGCCCACACTGGGCCCAGCCT	
	GGGTGAACATGTACGGCTCCACACGTAACTACACGCTGCT	
	GGATGAGCATCAGGACCTGAACGAGGGCCTGGGGGAGGG	
	TGTGTCCTTCCGGGCCCGGCTCCTGCTGGGCCTGGCTGTG	
	GAGATCGTAGACACCTCCAACCCTGAGCTCACCAGCTCCA	
	CAGAGGTGCAGGTGGAGCAGGCCACGCCCATCTCGGAGA	
	GCTGTGCAGGTAAAATGGAAGAATTCTTTCTCTTTGGAGC	
	CTTCCTGGAGGCCTCAATGATCGACCGGAGAAACGGAGA	
	CAAGCCCATCACCTTTGAGGTCACCATAGGCAACTATGGG	
	AACGAAGTTGATGGCCTGTCCCGGCCCCAGCGGCCTCGGC	
	CCCGGAAGGAGCCGGGGGATGAGGAAGAAGTAGACCTGA	
	TTCAGAACGCAAGTGATGACGAGGCCGGTGATGCCGGGG	
	ACCTGGCCTCAGTCTCCTCCACTCCACCAATGCGGCCCCA	
	GGTCACCGACAGGAACTACTTCCATCTGCCCTACCTGGAG	
	CGAAAGCCCTGCATCTACATCAAGAGCTGGTGGCCGGAC	
	CAGCGCCGCCGCCTCTACAATGCCAACATCATGGACCACA	
	TTGCCGACAAGCTGGAAGAAGGCCTGAACGACATACAGG	
	AGATGATCAAAACGGAGAAGTCCTACCCTGAGCGTCGCC	
	TGCGGGGCGTCCTGGAGGAGCTGAGCTGTGGCTGCTGCCG	
	CTTCCTCTCCCTCGCTGACAAGGACCAGGGCCACTCATCC	
	CGCACCAGGCTTGACCGGGAGCGCCTCAAGTCCTGCATGA	
	GGGAGCTGGAAAACATGGGGCAGCAGGCCAGGATGCTGC	
	GGGCCCAGGTGAAGCGGCACACGGTGCGGGACAAGCTGA	
	GGCTGTGCCAGAACTTCCTGCAGAAGCTGCGCTTCCTGGC	
	GGACGAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGG	
	AGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACT	
	CTTGCGTTTCTGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTA	
	AAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTA	
	ACAAAATAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGC	
	CTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT	
	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG	

	GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA	
5’ITR	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAG TGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	97
CMV энхансер	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG GTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGG	98
Последовательность гена CBA	GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTC CCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTA ATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGG GCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGG GCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGC G	99
Химерный интрон	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCG CCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT ACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCG GGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTT TCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCG TGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTG CCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTT TGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGG GCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAA AGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGG	100

	GGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCA CCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGT GCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTG CCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGG GCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGG CGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCG GCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGA GGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCC GAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCG CGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGG GCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCT TCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGC TGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTC TGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATG TTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAG	
5'OTOF	ATGGCCTTGCTCATCCACCTCAAGACAGTCTCGGAGCTGC GGGGCAGGGGCGACCGGATCGCCAAAGTGACTTTCCGAG GGCAATCCTTCTACTCTCGGGTCCTGGAGAACTGTGAGGA TGTGGCTGACTTTGATGAGACATTTCGGTGGCCGGTGGCC AGCAGCATCGACAGAAATGAGATGCTGGAGATTCAGGTT TTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGCAACAAGCTCATCGGGA CCTTCCGCATGGTGCTGCAGAAGGTGGTAGAGGAGAGCC ATGTGGAGGTGACTGACACGCTGATTGATGACAACAATG CTATCATCAAGACCAGCCTGTGCGTGGAGGTCCGGTATCA GGCCACTGACGGCACAGTGGGCTCCTGGGACGATGGGGA CTTCCTGGGAGATGAGTCTCTTCAAGAGGAAGAGAAGGA CAGCCAAGAGACGGATGGACTGCTCCCAGGCTCCCGGCC CAGCTCCCGGCCCCCAGGAGAGAAGAGCTTCCGGAGAGC CGGGAGGAGCGTGTTCTCCGCCATGAAGCTCGGCAAAAA CAGGTCTCACAAGGAGGAGCCCCAAAGACCAGATGAACC GGCGGTGCTGGAGATGGAAGACCTTGACCATCTGGCCATT CGGCTAGGAGATGGACTGGATCCCGACTCGGTGTCTCTAG CCTCAGTCACAGCTCTCACCACTAATGTCTCCAACAAGCG ATCTAAGCCAGACATTAAGATGGAGCCAAGTGCTGGGCG GCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCACGGTGATCGAGGCC	101

	CGGCAGCTGGTGGGCTTGAACATGGACCCTGTGGTGTGCG TGGAGGTGGGTGACGACAAGAAGTACACATCCATGAAGG AGTCCACTAACTGCCCCTATTACAACGAGTACTTCGTCTT CGACTTCCATGTCTCTCCGGATGTCATGTTTGACAAGATC ATCAAGATTTCGGTGATTCACTCCAAGAACCTGCTGCGCA GTGGCACCCTGGTGGGCTCCTTCAAAATGGACGTGGGAAC CGTGTACTCGCAGCCAGAGCACCAGTTCCATCACAAGTGG GCCATCCTGTCTGACCCCGATGACATCTCCTCGGGGCTGA AGGGCTACGTGAAGTGTGACGTTGCCGTGGTGGGCAAAG GGGACAACATCAAGACGCCCCACAAGGCCAATGAGACCG ACGAAGATGACATTGAGGGGAACTTGCTGCTCCCCGAGG GGGTGCCCCCCGAACGCCAGTGGGCCCGGTTCTATGTGAA AATTTACCGAGCAGAGGGGCTGCCCCGTATGAACACAAG CCTCATGGCCAATGTAAAGAAGGCTTTCATCGGTGAAAAC AAGGACCTCGTGGACCCCTACGTGCAAGTCTTCTTTGCTG GCCAGAAGGGCAAGACTTCAGTGCAGAAGAGCAGCTATG AGCCCCTGTGGAATGAGCAGGTCGTCTTTACAGACCTCTT CCCCCCACTCTGCAAACGCATGAAGGTGCAGATCCGAGA CTCGGACAAGGTCAACGACGTGGCCATCGGCACCCACTTC ATTGACCTGCGCAAGATTTCTAATGACGGAGACAAAGGCT TCCTGCCCACACTGGGCCCAGCCTGGGTGAACATGTACGG CTCCACACGTAACTACACGCTGCTGGATGAGCATCAGGAC CTGAACGAGGGCCTGGGGGAGGGTGTGTCCTTCCGGGCC CGGCTCCTGCTGGGCCTGGCTGTGGAGATCGTAGACACCT CCAACCCTGAGCTCACCAGCTCCACAGAGGTGCAGGTGG AGCAGGCCACGCCCATCTCGGAGAGCTGTGCAGGTAAAA TGGAAGAATTCTTTCTCTTTGGAGCCTTCCTGGAGGCCTC AATGATCGACCGGAGAAACGGAGACAAGCCCATCACCTT TGAGGTCACCATAGGCAACTATGGGAACGAAGTTGATGG CCTGTCCCGGCCCCAGCGGCCTCGGCCCCGGAAGGAGCC GGGGGATGAGGAAGAAGTAGACCTGATTCAGAACGCAAG TGATGACGAGGCCGGTGATGCCGGGGACCTGGCCTCAGT CTCCTCCACTCCACCAATGCGGCCCCAGGTCACCGACAGG AACTACTTCCATCTGCCCTACCTGGAGCGAAAGCCCTGCA TCTACATCAAGAGCTGGTGGCCGGACCAGCGCCGCCGCCT	

	CTACAATGCCAACATCATGGACCACATTGCCGACAAGCTG GAAGAAGGCCTGAACGACATACAGGAGATGATCAAAACG GAGAAGTCCTACCCTGAGCGTCGCCTGCGGGGCGTCCTGG AGGAGCTGAGCTGTGGCTGCTGCCGCTTCCTCTCCCTCGC TGACAAGGACCAGGGCCACTCATCCCGCACCAGGCTTGA CCGGGAGCGCCTCAAGTCCTGCATGAGGGAGCTGGAAAA CATGGGGCAGCAGGCCAGGATGCTGCGGGCCCAGGTGAA GCGGCACACGGTGCGGGACAAGCTGAGGCTGTGCCAGAA CTTCCTGCAGAAGCTGCGCTTCCTGGCGGACGAG	
SD интрон	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAA TAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTT TCT	102
AK	GGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAT	103
3'ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA	104

AKhOTOF3

Конструкция AKhOTOF3 содержит два ITR (SEQ ID NO: 97 и 104), рекомбиногенную последовательность AK (SEQ ID NO: 103), последовательность интрона SA (SEQ ID NO: 106), кодирующую область 3'OTOF (SEQ ID NO: 107) и последовательность polyA bgH (SEQ ID NO: 108). Полноразмерный AkhOTOF3 представлен SEQ ID NO: 105.

Таблица 2. AKhOTOF3

Наименование	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
AKhOTOF3	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTCGACG CGGCCGCACGCGTGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTG GTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGA ATTTTAACAAAATGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGAC ATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCCCCAGCACAGCATT	105

	CCCGACATCTTCATCTGGATGATGAGCAACAACAAGCGT GTCGCCTATGCCCGTGTGCCCTCCAAGGACCTGCTCTTC TCCATCGTGGAGGAGGAGACTGGCAAGGACTGCGCCAA GGTCAAGACGCTCTTCCTTAAGCTGCCAGGGAAGCGGG GCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGTGCAGGCCAAGGTG GAGCTGTACCTGTGGCTGGGCCTCAGCAAACAGCGCAA GGAGTTCCTGTGCGGCCTGCCCTGTGGCTTCCAGGAGGT CAAGGCAGCCCAGGGCCTGGGCCTGCATGCCTTCCCACC CGTCAGCCTGGTCTACACCAAGAAGCAGGCGTTCCAGCT CCGAGCGCACATGTACCAGGCCCGCAGCCTCTTTGCCGC CGACAGCAGCGGACTCTCAGACCCCTTTGCCCGCGTCTT CTTCATCAATCAGAGTCAGTGCACAGAGGTGCTGAATGA GACCCTGTGTCCCACCTGGGACCAGATGCTGGTGTTCGA CAACCTGGAGCTCTATGGTGAAGCTCATGAGCTGAGGG ACGATCCGCCCATCATTGTCATTGAAATCTATGACCAGG ATTCCATGGGCAAAGCTGACTTCATGGGCCGGACCTTCG CCAAACCCCTGGTGAAGATGGCAGACGAGGCGTACTGC CCACCCCGCTTCCCACCTCAGCTCGAGTACTACCAGATC TACCGTGGCAACGCCACAGCTGGAGACCTGCTGGCGGC CTTCGAGCTGCTGCAGATTGGACCAGCAGGGAAGGCTG ACCTGCCCCCCATCAATGGCCCGGTGGACGTGGACCGA GGTCCCATCATGCCCGTGCCCATGGGCATCCGGCCCGTG CTCAGCAAGTACCGAGTGGAGGTGCTGTTCTGGGGCCTA CGGGACCTAAAGCGGGTGAACCTGGCCCAGGTGGACCG GCCACGGGTGGACATCGAGTGTGCAGGGAAGGGGGTGC AGTCGTCCCTGATCCACAATTATAAGAAGAACCCCAACT TCAACACCCTCGTCAAGTGGTTTGAAGTGGACCTCCCAG AGAACGAGCTGCTGCACCCGCCCTTGAACATCCGTGTGG TGGACTGCCGGGCCTTCGGTCGCTACACACTGGTGGGCT CCCATGCCGTCAGCTCCCTGCGACGCTTCATCTACCGGC CCCCAGACCGCTCGGCCCCCAGCTGGAACACCACGGTC AGGCTTCTCCGGCGCTGCCGTGTGCTGTGCAATGGGGGC TCCTCCTCTCACTCCACAGGGGAGGTTGTGGTGACTATG GAGCCAGAGGTACCCATCAAGAAACTGGAGACCATGGT GAAGCTGGACGCGACTTCTGAAGCTGTTGTCAAGGTGG	

	ATGTGGCTGAGGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGAA GAAGGGCACTGCGGAGGAGCCAGAGGAGGAGGAGCCA GACGAGAGCATGCTGGACTGGTGGTCCAAGTACTTTGCC TCCATTGACACCATGAAGGAGCAACTTCGACAACAAGA GCCCTCTGGAATTGACTTGGAGGAGAAGGAGGAAGTGG ACAATACCGAGGGCCTGAAGGGGTCAATGAAGGGCAAG GAGAAGGCAAGGGCTGCCAAAGAGGAGAAGAAGAAGA AAACTCAGAGCTCTGGCTCTGGCCAGGGGTCCGAGGCC CCCGAGAAGAAGAAACCCAAGATTGATGAGCTTAAGGT ATACCCCAAAGAGCTGGAGTCCGAGTTTGATAACTTTGA GGACTGGCTGCACACTTTCAACTTGCTTCGGGGCAAGAC CGGGGATGATGAGGATGGCTCCACCGAGGAGGAGCGCA TTGTGGGACGCTTCAAGGGCTCCCTCTGCGTGTACAAAG TGCCACTCCCAGAGGACGTGTCCCGGGAAGCCGGCTAC GACTCCACCTACGGCATGTTCCAGGGCATCCCGAGCAAT GACCCCATCAATGTGCTGGTCCGAGTCTATGTGGTCCGG GCCACGGACCTGCACCCTGCTGACATCAACGGCAAAGC TGACCCCTACATCGCCATCCGGCTAGGCAAGACTGACAT CCGCGACAAGGAGAACTACATCTCCAAGCAGCTCAACC CTGTCTTTGGGAAGTCCTTTGACATCGAGGCCTCCTTCCC CATGGAATCCATGCTGACGGTGGCTGTGTATGACTGGGA CCTGGTGGGCACTGATGACCTCATTGGGGAAACCAAGA TCGACCTGGAGAACCGCTTCTACAGCAAGCACCGCGCC ACCTGCGGCATCGCCCAGACCTACTCCACACATGGCTAC AATATCTGGCGGGACCCCATGAAGCCCAGCCAGATCCT GACCCGCCTCTGCAAAGACGGCAAAGTGGACGGCCCCC ACTTTGGGCCCCCTGGGAGAGTGAAGGTGGCCAACCGC GTCTTCACTGGGCCCTCTGAGATTGAGGACGAGAACGGT CAGAGGAAGCCCACAGACGAGCATGTGGCGCTGTTGGC CCTGAGGCACTGGGAGGACATCCCCCGCGCAGGCTGCC GCCTGGTGCCAGAGCATGTGGAGACGAGGCCGCTGCTC AACCCCGACAAGCCGGGCATCGAGCAGGGCCGCCTGGA GCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGGACATGCCAGCCCC TGGGACGCCTCTGGACATCTCACCTCGGAAGCCCAAGA AGTACGAGCTGCGGGTCATCATCTGGAACACAGATGAG	

	GTGGTCTTGGAGGACGACGACTTCTTCACAGGGGAGAA GTCCAGTGACATCTTCGTGAGGGGGTGGCTGAAGGGCC AGCAGGAGGACAAGCAGGACACAGACGTCCACTACCAC TCCCTCACTGGCGAGGGCAACTTCAACTGGCGCTACCTG TTCCCCTTCGACTACCTGGCGGCGGAGGAGAAGATCGTC ATCTCCAAGAAGGAGTCCATGTTCTCCTGGGACGAGACC GAGTACAAGATCCCCGCGCGGCTCACCCTGCAGATCTGG GATGCGGACCACTTCTCCGCTGACGACTTCCTGGGGGCC ATCGAGCTGGACCTGAACCGGTTCCCGCGGGGCGCAAA GACAGCCAAGCAGTGCACCATGGAGATGGCCACCGGGG AGGTGGACGTGCCCCTCGTGTCCATCTTCAAGCAAAAGC GCGTCAAAGGCTGGTGGCCCCTCCTGGCCCGCAATGAG AACGATGAGTTTGAGCTCACGGGCAAGGTGGAGGCTGA GCTGCATTTACTGACAGCAGAGGAGGCAGAGAAGAACC CAGTGGGCCTGGCCCGCAATGAACCTGACCCCCTAGAG AAACCCAACCGGCCCGACACGGCCTTCGTCTGGTTCCTC AACCCTCTCAAGTCCATCAAGTACCTCATCTGCACCCGG TACAAGTGGCTCATCATCAAGATCGTGCTGGCGCTGTTG GGGCTGCTCATGTTGGGGCTCTTCCTCTACAGCCTCCCT GGCTACATGGTCAAAAAGCTCCTTGGGGCATGAACTAGT GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT CTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGA AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC TCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCG CCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA	
5’ITR	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	97

AK	GGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAG CTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAT	103
SA интрон	GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTT TCTCTCCACAG	106
3'OTOF	CCCCAGCACAGCATTCCCGACATCTTCATCTGGATGATG AGCAACAACAAGCGTGTCGCCTATGCCCGTGTGCCCTCC AAGGACCTGCTCTTCTCCATCGTGGAGGAGGAGACTGGC AAGGACTGCGCCAAGGTCAAGACGCTCTTCCTTAAGCTG CCAGGGAAGCGGGGCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGT GCAGGCCAAGGTGGAGCTGTACCTGTGGCTGGGCCTCA GCAAACAGCGCAAGGAGTTCCTGTGCGGCCTGCCCTGTG GCTTCCAGGAGGTCAAGGCAGCCCAGGGCCTGGGCCTG CATGCCTTCCCACCCGTCAGCCTGGTCTACACCAAGAAG CAGGCGTTCCAGCTCCGAGCGCACATGTACCAGGCCCGC AGCCTCTTTGCCGCCGACAGCAGCGGACTCTCAGACCCC TTTGCCCGCGTCTTCTTCATCAATCAGAGTCAGTGCACA GAGGTGCTGAATGAGACCCTGTGTCCCACCTGGGACCA GATGCTGGTGTTCGACAACCTGGAGCTCTATGGTGAAGC TCATGAGCTGAGGGACGATCCGCCCATCATTGTCATTGA AATCTATGACCAGGATTCCATGGGCAAAGCTGACTTCAT GGGCCGGACCTTCGCCAAACCCCTGGTGAAGATGGCAG ACGAGGCGTACTGCCCACCCCGCTTCCCACCTCAGCTCG AGTACTACCAGATCTACCGTGGCAACGCCACAGCTGGA GACCTGCTGGCGGCCTTCGAGCTGCTGCAGATTGGACCA GCAGGGAAGGCTGACCTGCCCCCCATCAATGGCCCGGT GGACGTGGACCGAGGTCCCATCATGCCCGTGCCCATGG GCATCCGGCCCGTGCTCAGCAAGTACCGAGTGGAGGTG CTGTTCTGGGGCCTACGGGACCTAAAGCGGGTGAACCTG GCCCAGGTGGACCGGCCACGGGTGGACATCGAGTGTGC AGGGAAGGGGGTGCAGTCGTCCCTGATCCACAATTATA AGAAGAACCCCAACTTCAACACCCTCGTCAAGTGGTTTG AAGTGGACCTCCCAGAGAACGAGCTGCTGCACCCGCCC TTGAACATCCGTGTGGTGGACTGCCGGGCCTTCGGTCGC TACACACTGGTGGGCTCCCATGCCGTCAGCTCCCTGCGA CGCTTCATCTACCGGCCCCCAGACCGCTCGGCCCCCAGC	107

	TGGAACACCACGGTCAGGCTTCTCCGGCGCTGCCGTGTG CTGTGCAATGGGGGCTCCTCCTCTCACTCCACAGGGGAG GTTGTGGTGACTATGGAGCCAGAGGTACCCATCAAGAA ACTGGAGACCATGGTGAAGCTGGACGCGACTTCTGAAG CTGTTGTCAAGGTGGATGTGGCTGAGGAGGAGAAGGAG AAGAAGAAGAAGAAGGGCACTGCGGAGGAGCCAG AGGAGGAGGAGCCAGACGAGAGCATGCTGGACTGGTGG TCCAAGTACTTTGCCTCCATTGACACCATGAAGGAGCAA CTTCGACAACAAGAGCCCTCTGGAATTGACTTGGAGGA GAAGGAGGAAGTGGACAATACCGAGGGCCTGAAGGGGT CAATGAAGGGCAAGGAGAAGGCAAGGGCTGCCAAAGA GGAGAAGAAGAAGAAAACTCAGAGCTCTGGCTCTGGCC AGGGGTCCGAGGCCCCCGAGAAGAAGAAACCCAAGATT GATGAGCTTAAGGTATACCCCAAAGAGCTGGAGTCCGA GTTTGATAACTTTGAGGACTGGCTGCACACTTTCAACTT GCTTCGGGGCAAGACCGGGGATGATGAGGATGGCTCCA CCGAGGAGGAGCGCATTGTGGGACGCTTCAAGGGCTCC CTCTGCGTGTACAAAGTGCCACTCCCAGAGGACGTGTCC CGGGAAGCCGGCTACGACTCCACCTACGGCATGTTCCAG GGCATCCCGAGCAATGACCCCATCAATGTGCTGGTCCGA GTCTATGTGGTCCGGGCCACGGACCTGCACCCTGCTGAC ATCAACGGCAAAGCTGACCCCTACATCGCCATCCGGCTA GGCAAGACTGACATCCGCGACAAGGAGAACTACATCTC CAAGCAGCTCAACCCTGTCTTTGGGAAGTCCTTTGACAT CGAGGCCTCCTTCCCCATGGAATCCATGCTGACGGTGGC TGTGTATGACTGGGACCTGGTGGGCACTGATGACCTCAT TGGGGAAACCAAGATCGACCTGGAGAACCGCTTCTACA GCAAGCACCGCGCCACCTGCGGCATCGCCCAGACCTACT CCACACATGGCTACAATATCTGGCGGGACCCCATGAAG CCCAGCCAGATCCTGACCCGCCTCTGCAAAGACGGCAA AGTGGACGGCCCCCACTTTGGGCCCCCTGGGAGAGTGA AGGTGGCCAACCGCGTCTTCACTGGGCCCTCTGAGATTG AGGACGAGAACGGTCAGAGGAAGCCCACAGACGAGCAT GTGGCGCTGTTGGCCCTGAGGCACTGGGAGGACATCCCC CGCGCAGGCTGCCGCCTGGTGCCAGAGCATGTGGAGAC	

	GAGGCCGCTGCTCAACCCCGACAAGCCGGGCATCGAGC AGGGCCGCCTGGAGCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGG ACATGCCAGCCCCTGGGACGCCTCTGGACATCTCACCTC GGAAGCCCAAGAAGTACGAGCTGCGGGTCATCATCTGG AACACAGATGAGGTGGTCTTGGAGGACGACGACTTCTTC ACAGGGGAGAAGTCCAGTGACATCTTCGTGAGGGGGTG GCTGAAGGGCCAGCAGGAGGACAAGCAGGACACAGAC GTCCACTACCACTCCCTCACTGGCGAGGGCAACTTCAAC TGGCGCTACCTGTTCCCCTTCGACTACCTGGCGGCGGAG GAGAAGATCGTCATCTCCAAGAAGGAGTCCATGTTCTCC TGGGACGAGACCGAGTACAAGATCCCCGCGCGGCTCAC CCTGCAGATCTGGGATGCGGACCACTTCTCCGCTGACGA CTTCCTGGGGGCCATCGAGCTGGACCTGAACCGGTTCCC GCGGGGCGCAAAGACAGCCAAGCAGTGCACCATGGAGA TGGCCACCGGGGAGGTGGACGTGCCCCTCGTGTCCATCT TCAAGCAAAAGCGCGTCAAAGGCTGGTGGCCCCTCCTG GCCCGCAATGAGAACGATGAGTTTGAGCTCACGGGCAA GGTGGAGGCTGAGCTGCATTTACTGACAGCAGAGGAGG CAGAGAAGAACCCAGTGGGCCTGGCCCGCAATGAACCT GACCCCCTAGAGAAACCCAACCGGCCCGACACGGCCTT CGTCTGGTTCCTCAACCCTCTCAAGTCCATCAAGTACCT CATCTGCACCCGGTACAAGTGGCTCATCATCAAGATCGT GCTGGCGCTGTTGGGGCTGCTCATGTTGGGGCTCTTCCT CTACAGCCTCCCTGGCTACATGGTCAAAAAGCTCCTTGG GGCA	
bGHpA	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG	108
3'ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA	104

Таблица 3. Anc80L65

Наименование	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
Anc80L65	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKA YDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAV FQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG KKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGSN TMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLNFKLFNIQV KEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGC LPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML RTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYL SRTQTTSGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQ QRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMA THKDDEDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEI KTTNPVATEEYGTVATNLQSANTAPATGTVNSQGALPGMV WQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQI LIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE NSKRWNPEIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRY LTRNL*	109

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Следует понимать, что слова, которые были использованы, являются словами описания, а не ограничения, и что изменения могут быть сделаны в пределах объема прилагаемой формулы изобретения без отклонения от истинного объема и сущности описания в его более широких аспектах.

Хотя настоящее описание было описано достаточно подробно и с некоторыми подробностями в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено какими-либо такими подробностями или вариантами осуществления или любым конкретным вариантом осуществления, но должно толковаться со ссылками к прилагаемой формуле изобретения, чтобы обеспечить максимально широкое толкование такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, чтобы эффективно охватить предполагаемый объем изобретения.

Следует понимать, что хотя описание было описано вместе с его подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема описания, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, заголовки разделов, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 96.

2. Рекомбинантный вектор AAV SEQ ID NO: 105.

3. Рекомбинантный вектор AAV, который содержит, по порядку от 5' до 3':

5' последовательность ITR SEQ ID NO: 97;

промотор CAG, содержащий элемент раннего энхансера CMV SEQ ID NO: 98, последовательность гена бета-актина цыпленка SEQ ID NO: 99 и химерный интрон SEQ ID NO: 100;

кодирующую область 5'OTOF, которая содержит экзоны с 1 по (и до) 21 кДНК OTOF;

последовательность интрона SD SEQ ID NO: 102;

рекомбиногенную последовательность AK SEQ ID NO: 103; и

3' последовательность ITR SEQ ID NO: 104.

4. Рекомбинантный вектор AAV по п.3, отличающийся тем, что кодирующая область 5'OTOF представляет собой SEQ ID NO: 101.

5. Рекомбинантный вектор AAV по п.3 или 4, в котором кодирующая область 5'OTOF на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5% или, по меньшей мере, 99,9% идентична SEQ ID NO: 101, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 101.

6. Рекомбинантный вектор AAV, который содержит, по порядку от 5' до 3':

5' последовательность ITR SEQ ID NO: 97;

рекомбиногенную последовательность AK SEQ ID NO: 103;

последовательность интрона SA SEQ ID NO: 106;

3' кодирующую область OTOF, которая содержит экзоны с 22 по (и до) экзон 48 кДНК OTOF;

последовательность polyA bgH SEQ ID NO: 108; и

3' последовательность ITR SEQ ID NO: 104.

7. Рекомбинантный вектор AAV по п. 6, отличающийся тем, что кодирующая область 3' OTOF представляет собой SEQ ID NO: 107.

8. Рекомбинантный вектор AAV по п.6 или 7, отличающийся тем, что кодирующая область 3' OTOF на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5% или, по меньшей мере, 99,9% идентична SEQ ID NO: 107, и кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 107.

9. Рекомбинантная частица AAV (частица rAAV), содержащая рекомбинантный

вектор AAV по любому из пп.1-8, инкапсулированный капсидом Anc80.

10. Частица rAAV по п.9, отличающаяся тем, что капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

11. Композиция, содержащая первую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV по п.1, и вторую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV по п.2.

12. Композиция, содержащая первую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 3-5, и вторую частицу rAAV, содержащую рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 6-8.

13. Композиция по п.11 или 12, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй частиц rAAV независимо инкапсулирована капсидом Anc80.

14. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 109.

15. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что при введении композиции в клетку человека, рекомбинантные векторы AAV по пп.1 и 2 подвергаются конкатамеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую полноразмерный белок отоферлин внутри клетки.

16. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что при введении композиции в клетку человека, рекомбинантные векторы AAV по любому из пп.3-5 и рекомбинантные векторы AAV по любому из пп.6-8 подвергаются конкатамеризации или гомологичной рекомбинации друг с другом, тем самым образуя рекомбинированную нуклеиновую кислоту, кодирующую полноразмерный белок отоферлин внутри клетки.

17. Композиция по п.15 или 16, дополнительно содержащая, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый эксципиент.

18. Способ, включающий введение в улитку млекопитающего терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.11-17.

19. Способ по п.18, где млекопитающим является человек.

20. Способ по п.18 или 19, где млекопитающее ранее было идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

21. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина в клетке млекопитающего, включающий введение композиции по любому из пп.11-17 в клетку млекопитающего.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой внутреннюю волосковую клетку.

23. Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку человека.

24. Способ по любому из пп.21-23, отличающийся тем, что ранее было определено, что клетка млекопитающего имеет дефектный ген отоферлина.

25. Способ увеличения экспрессии полноразмерного белка отоферлина во внутренней волосковой клетке улитки млекопитающего, включающий введение в улитку

млекопитающего терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 11-17.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что млекопитающее ранее было идентифицировано как имеющее дефектный ген отоферлина.

27. Способ по п.25 или 26, где млекопитающим является человек.

28. Способ лечения бессимптомной нейросенсорной потери слуха у субъекта, у которого выявлен дефектный ген отоферлина, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 11-17 в улитку субъекта.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что субъектом является человек.

30. Способ по п.28 или 29, дополнительно включающий, перед стадией введения, определение наличия у субъекта дефектного гена отоферлина.

31. Способ по любому из пп.28-30, отличающийся тем, что композицию вводят в улитку с помощью микрокатетера.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM.

33. Способ по п.31 или 32, отличающийся тем, что дистальный конец микрокатетера состоит из, по меньшей мере, одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

34. Способ по любому из пп.28-30, отличающийся тем, что композицию вводят в улитку с помощью устройства, содержащего иглу.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что игла имеет изогнутую часть и изогнутый кончик.

36. Набор, содержащий композицию по любому из пп.11-17.

37. Набор по п.36, отличающийся тем, что композиция предварительно загружена в устройство.

38. Набор по п.37, отличающийся тем, что устройство представляет собой микрокатетер.

39. Набор по п.38, отличающийся тем, что микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM.

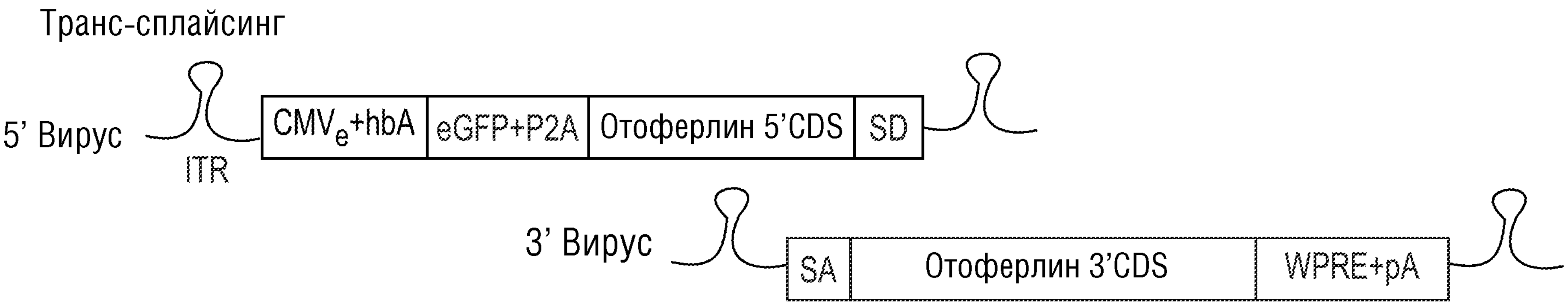
40. Набор по п.38 или 39, отличающийся тем, что дистальный конец микрокатетера состоит, по меньшей мере, из одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

41. Набор по п.36, дополнительно содержащий устройство.

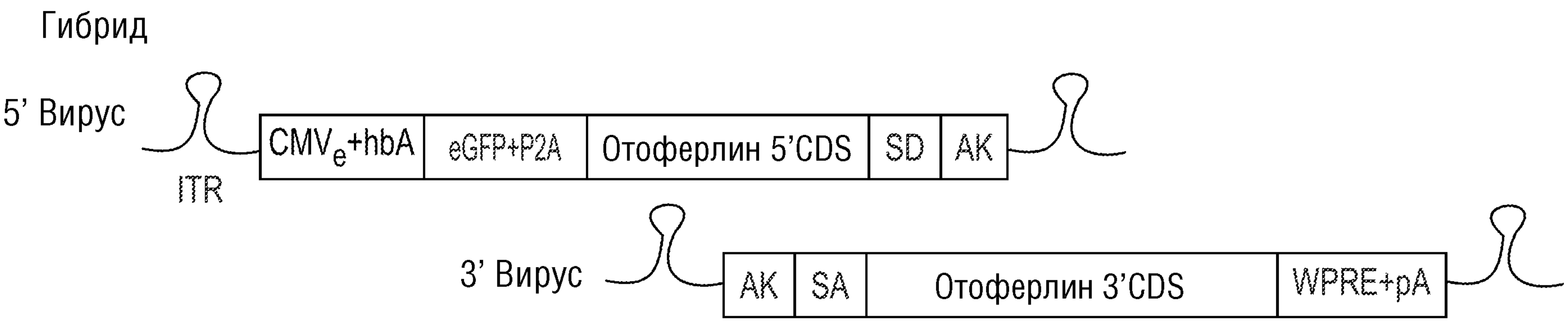
42. Набор по п.41, отличающийся тем, что устройство представляет собой устройство, описанное на любой из фигур 82-87.

43. Набор по п.42, отличающийся тем, что устройство содержит иглу, имеющую изогнутую часть и наклонный кончик.

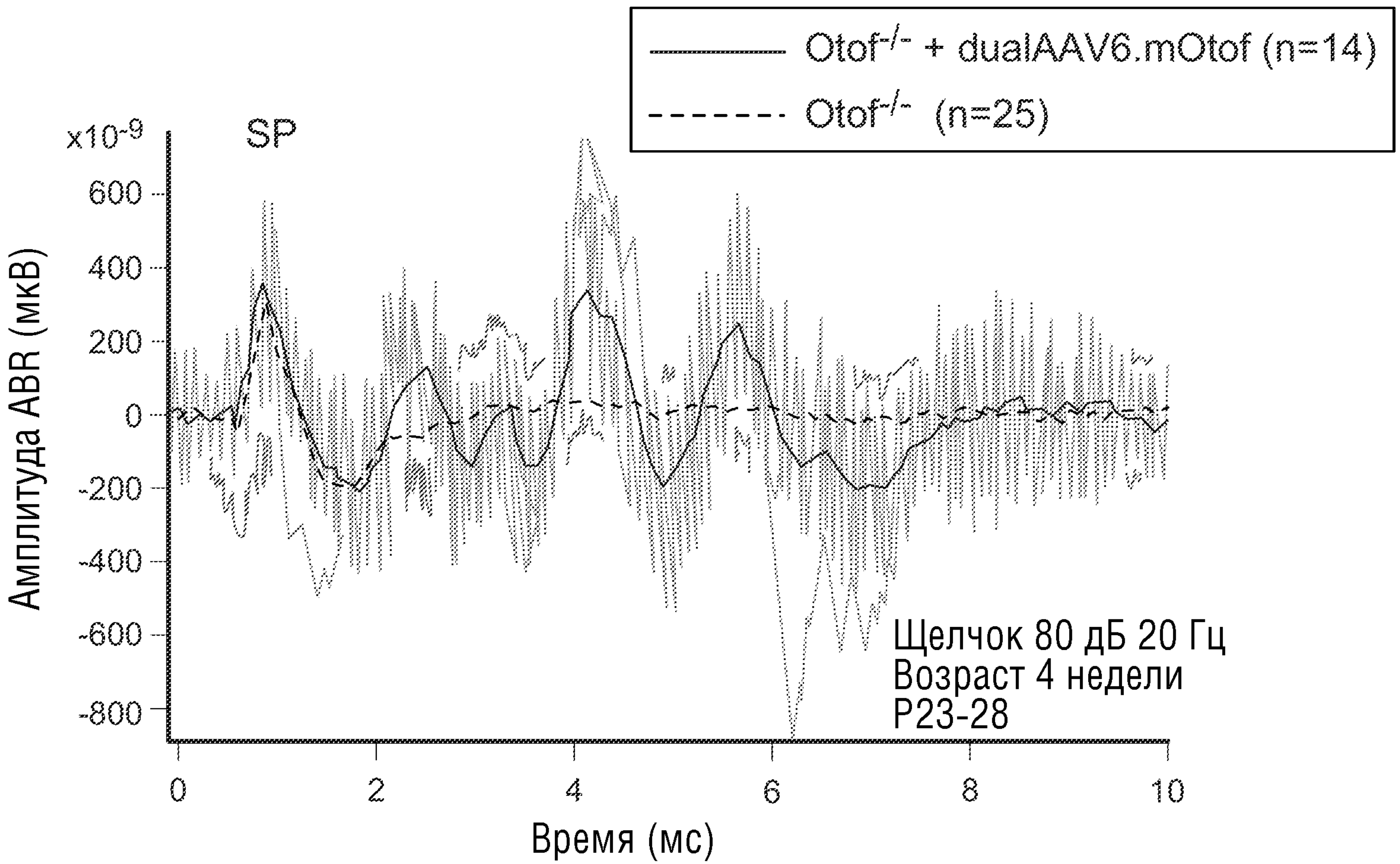
ФИГ.1


Транс-сплайсинг
5' Вирус
ITR
CMV_e+hbA
eGFP+P2A
Отоферлин 5'CDS
SD
3' Вирус
SA
Отоферлин 3'CDS
WPRE+pA

ФИГ.2

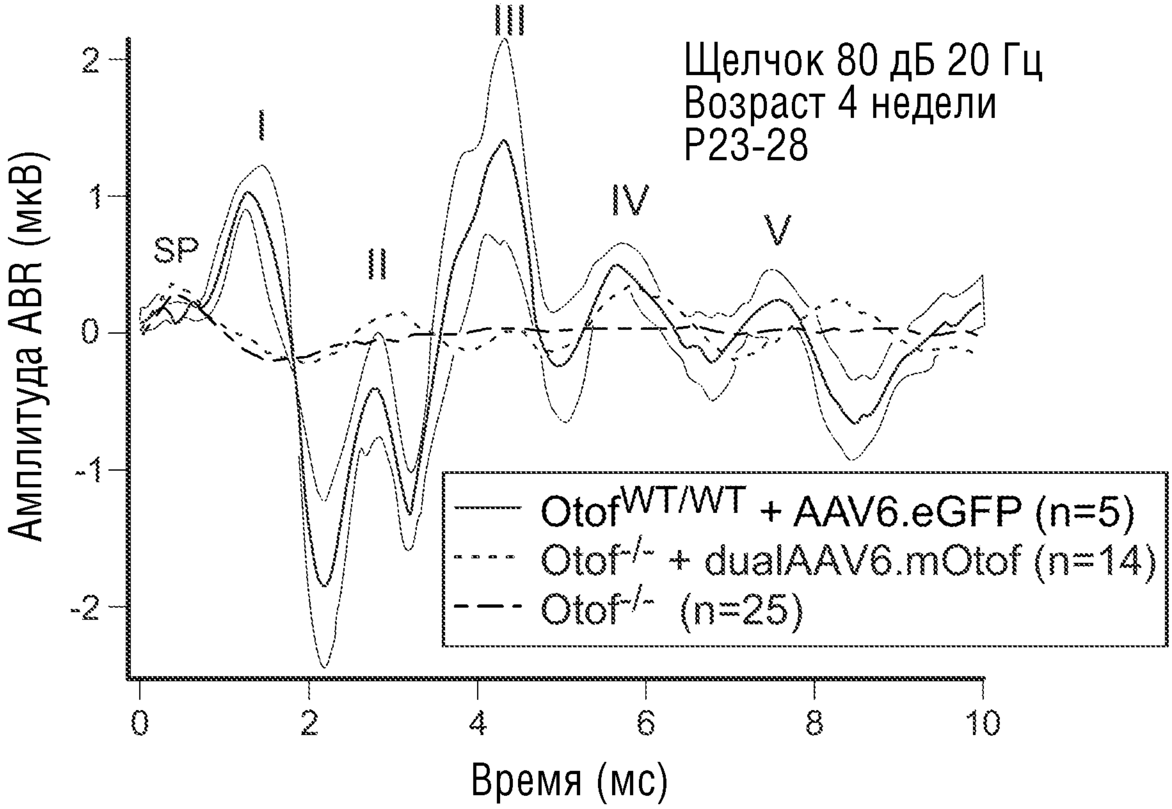

Гибрид
5' Вирус
ITR
CMV_e+hbA
eGFP+P2A
Отоферлин 5'CDS
SD
AK
3' Вирус
AK
SA
Отоферлин 3'CDS
WPRE+pA

ФИГ.3

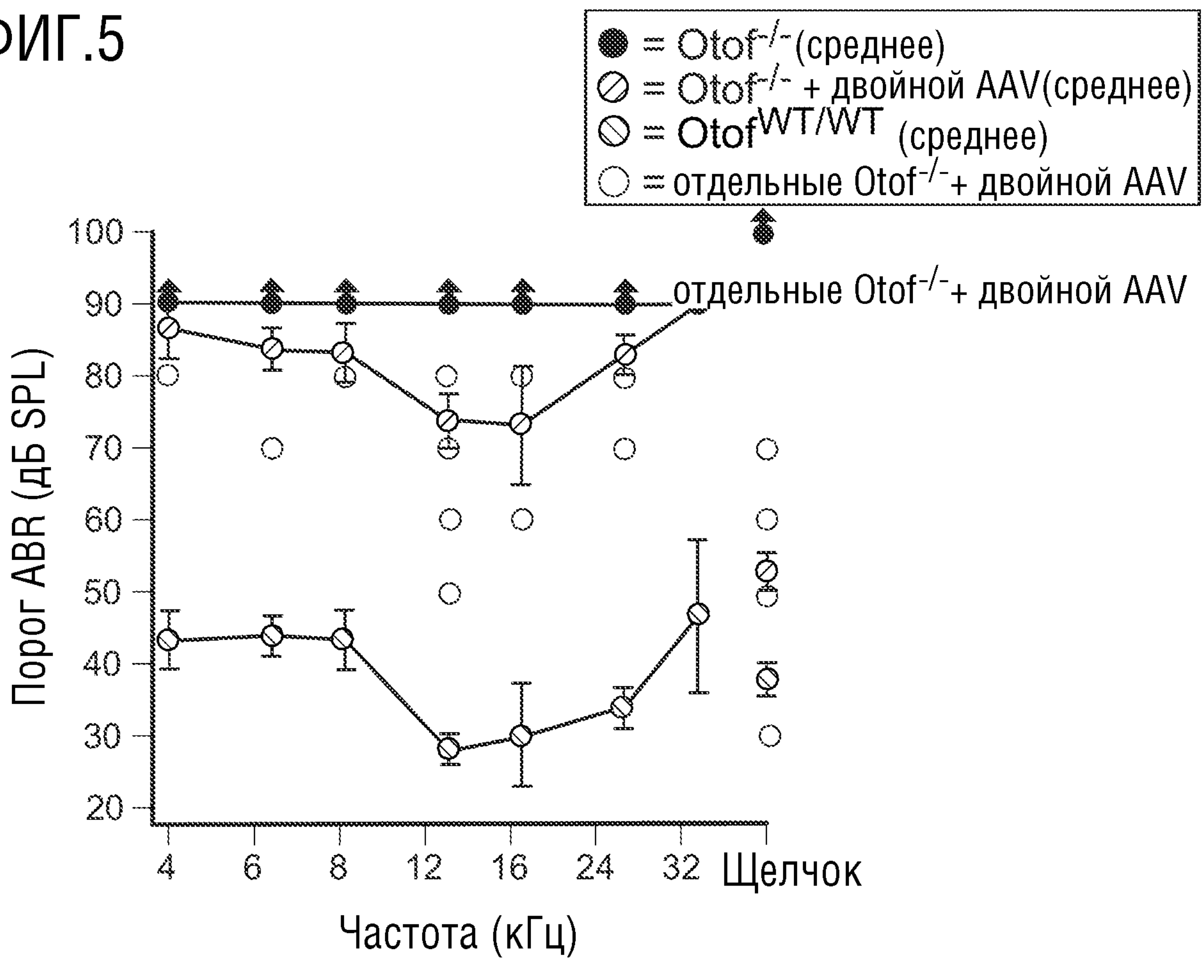


Otof-/- + dualAAV6.mOtof (n=14)
Otof-/- (n=25)
SP
x10-9
600
400
200
0
-200
-400
-600
-800
Амплитуда ABR (мкВ)
0
2
4
6
8
10
Время (мс)
Щелчок 80 дБ 20 Гц
Возраст 4 недели
P23-28

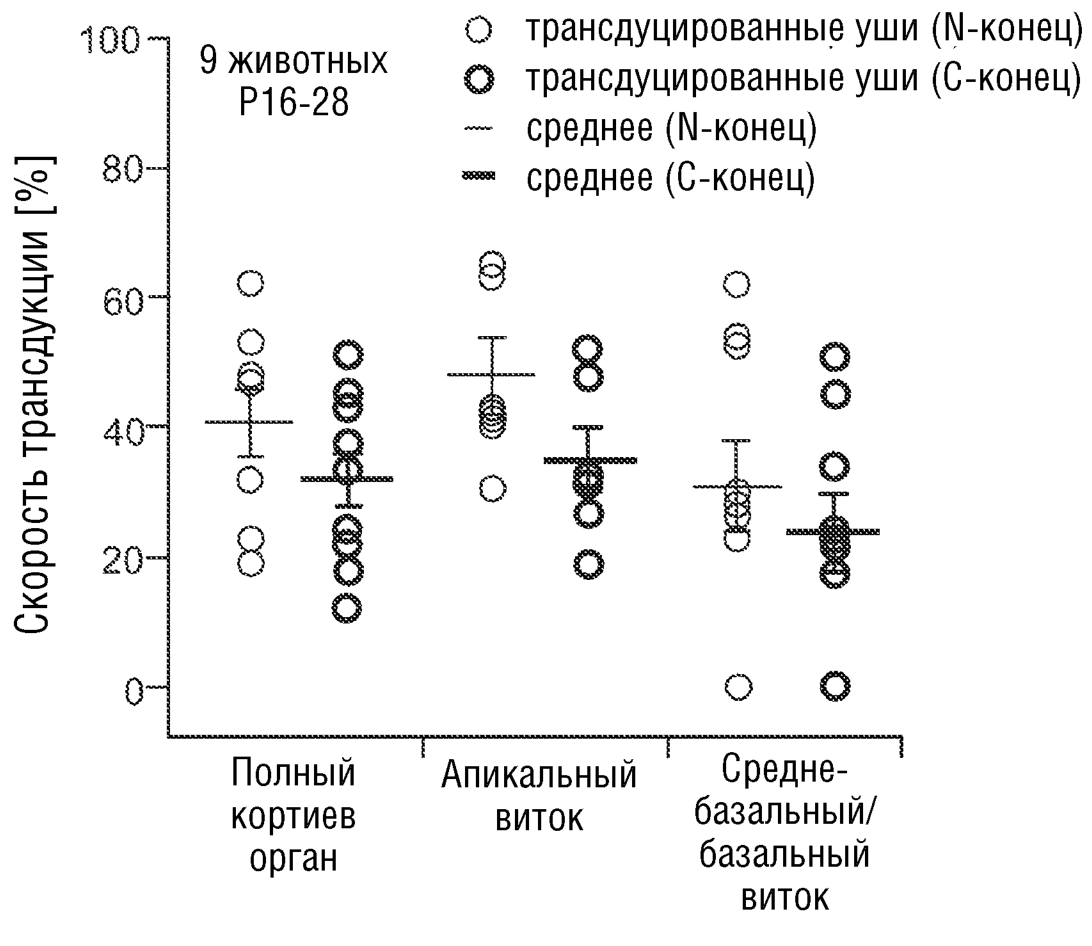
ФИГ.4


Щелчок 80 дБ 20 Гц
Возраст 4 недели
P23-28
Амплитуда ABR (мкВ)
Время (мс)
SP
I
II
III
IV
V
Otof$^{WT/WT}$ + AAV6.eGFP (n=5)
Otof$^{-/-}$ + dualAAV6.mOtof (n=14)
Otof$^{-/-}$ (n=25)

ФИГ.5

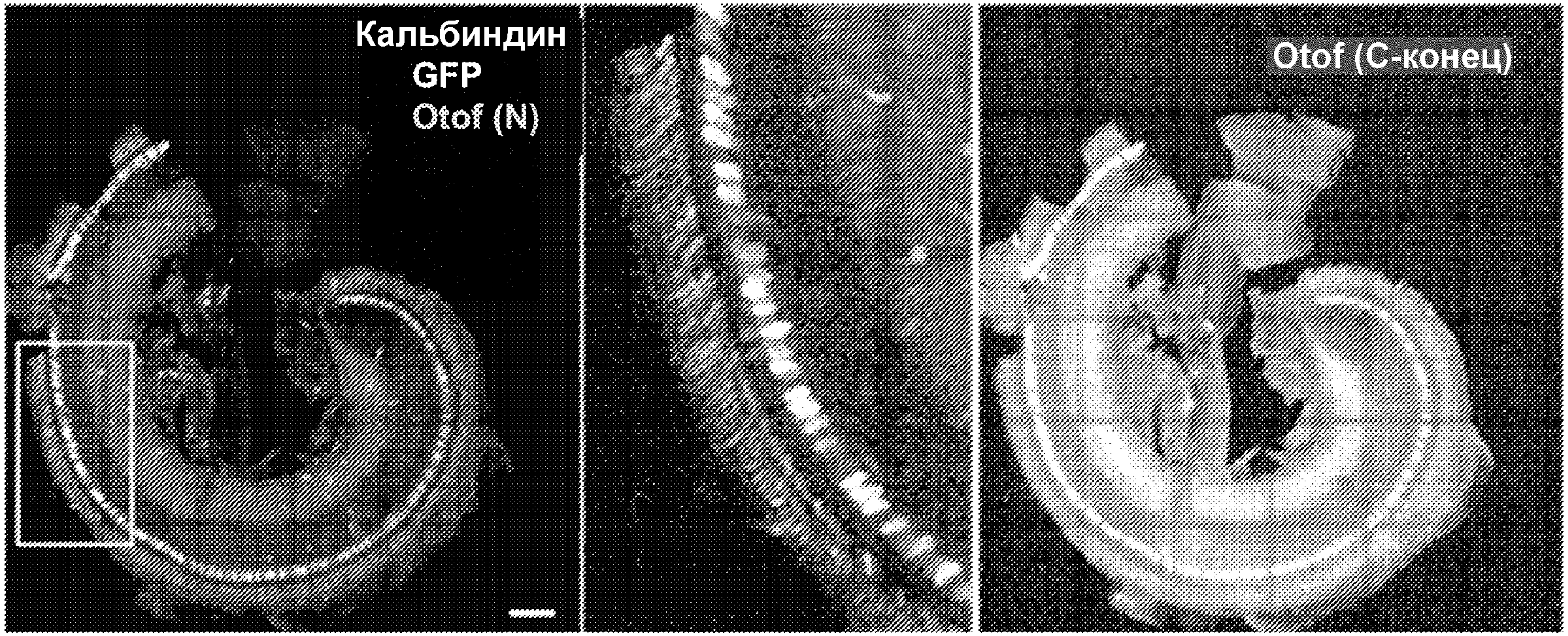

= Otof$^{-/-}$(среднее)
= Otof$^{-/-}$ + двойной AAV(среднее)
= Otof$^{WT/WT}$ (среднее)
= отдельные Otof$^{-/-}$+ двойной AAV
отдельные Otof$^{-/-}$+ двойной AAV
Порог ABR (дБ SPL)
Частота (кГц)
Щелчок

ФИГ.6

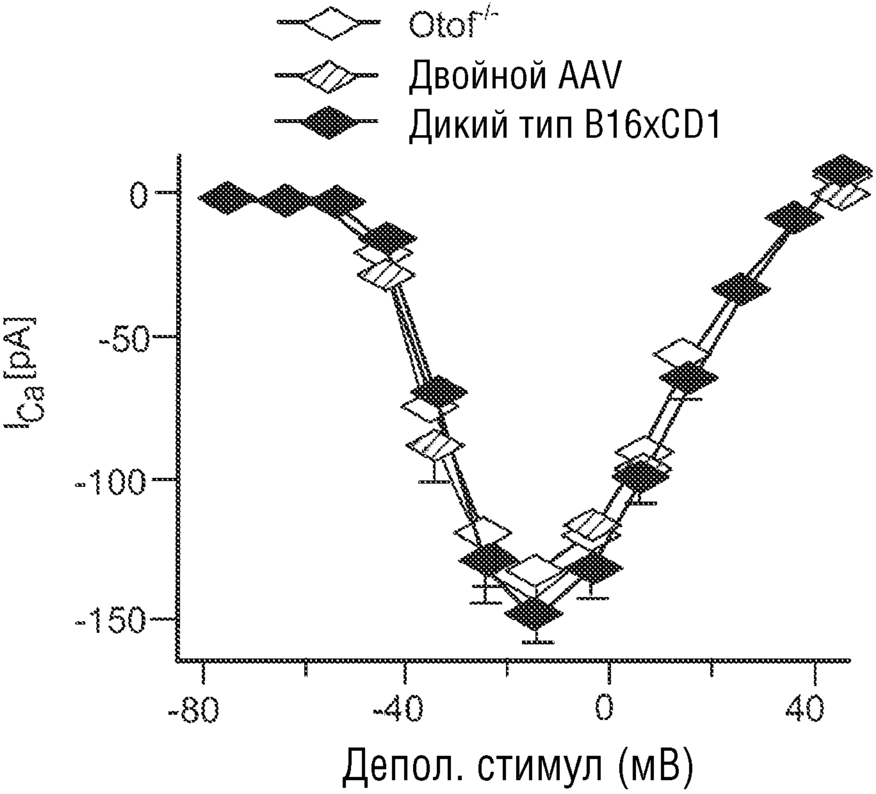


9 животных
P16-28
трансдуцированные уши (N-конец)
трансдуцированные уши (C-конец)
среднее (N-конец)
среднее (C-конец)
Скорость трансдукции [%]
100
80
60
40
20
0
Полный кортиев орган
Апикальный виток
Средне-базальный/базальный виток

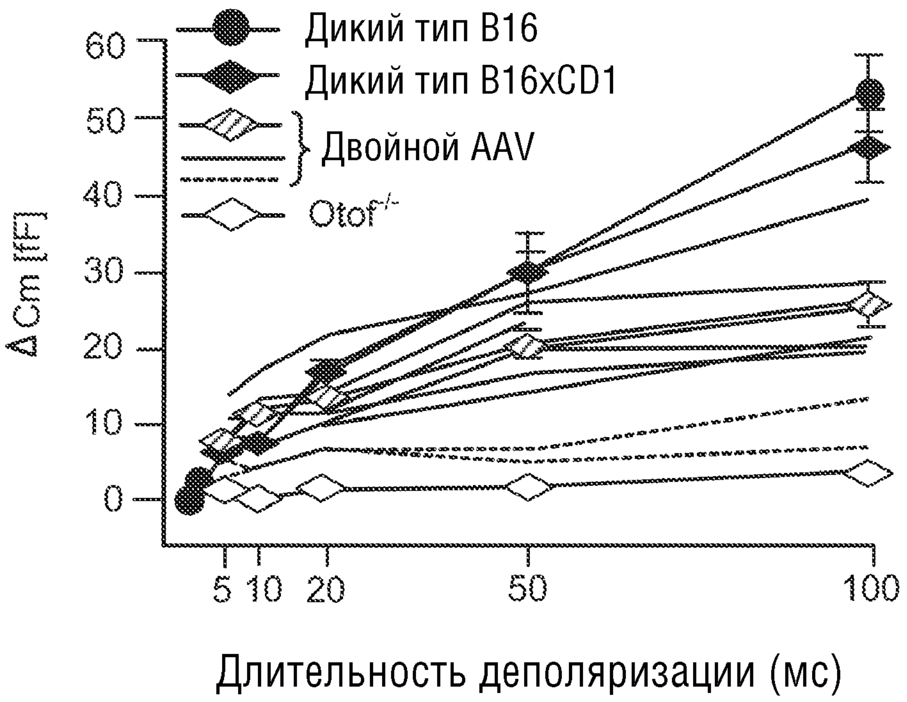
ФИГ.7



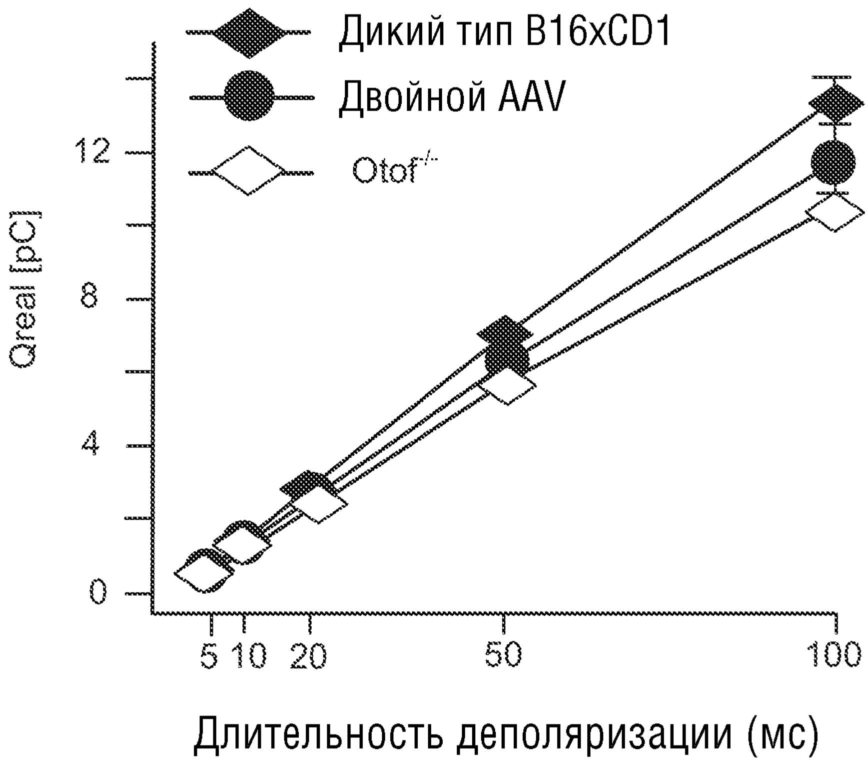
ФИГ.8


Otof-/-
Двойной AAV
Дикий тип B16xCD1
0
-50
-100
-150
I_{Ca} [pA]
-80
-40
0
40
Депол. стимул (мВ)

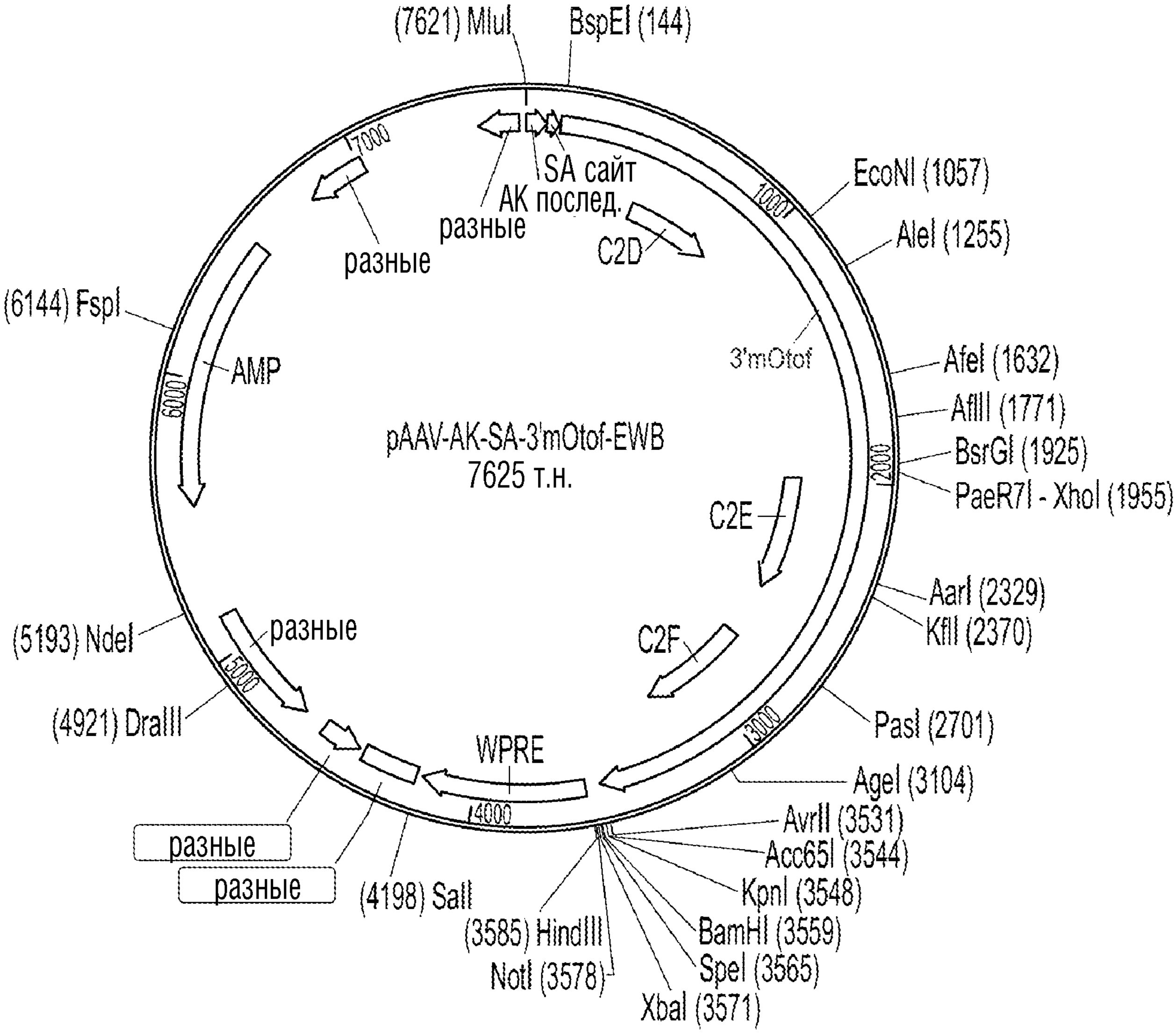
ФИГ.9


Дикий тип B16
Дикий тип B16xCD1
Двойной AAV
Otof-/-
60
50
40
30
20
10
0
ΔCm [fF]
5
10
20
50
100
Длительность деполяризации (мс)

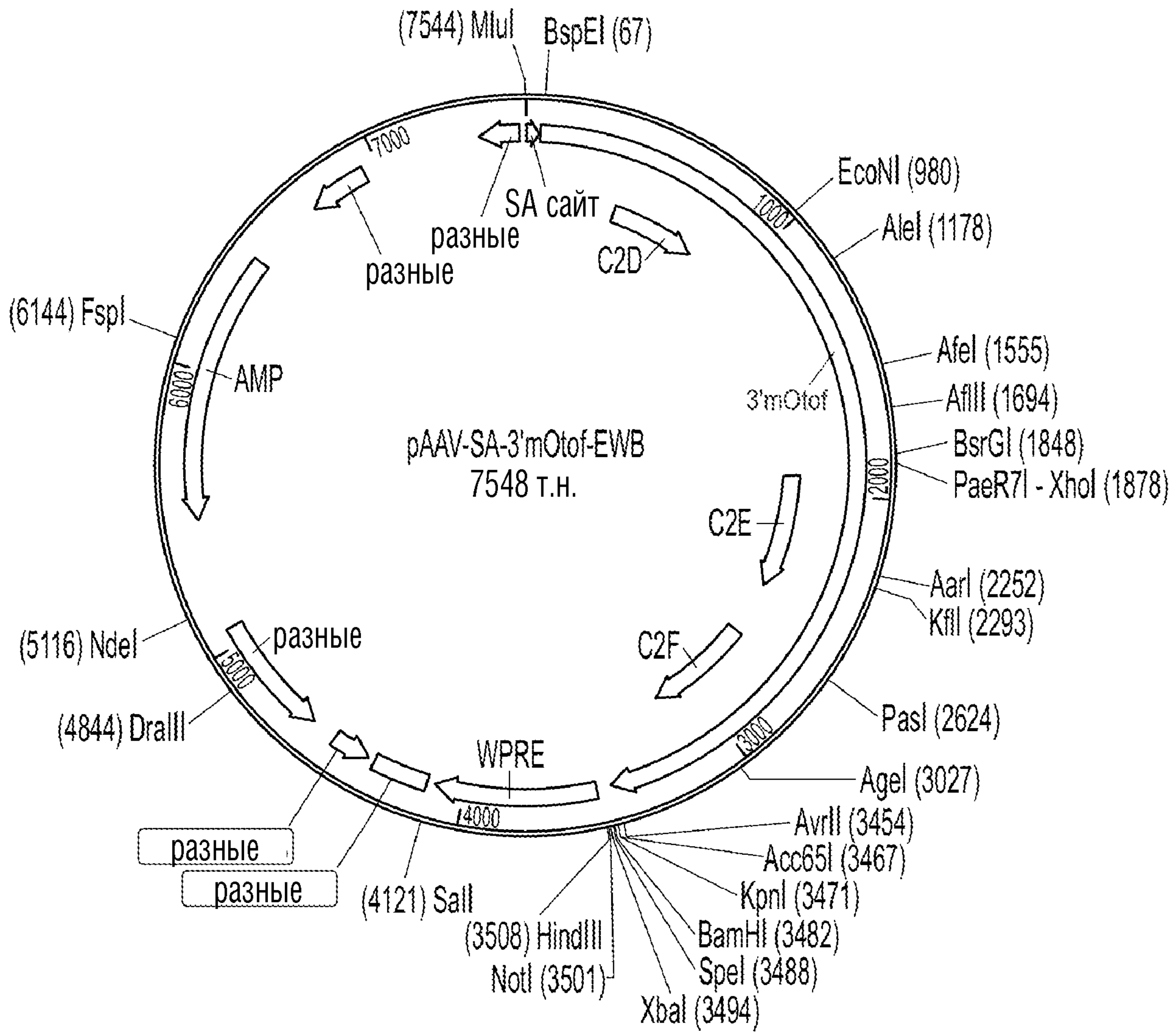
ФИГ.10


Дикий тип B16xCD1
Двойной AAV
Otof-/-
Qreal [pC]
0
4
8
12
5
10
20
50
100
Длительность деполяризации (мс)

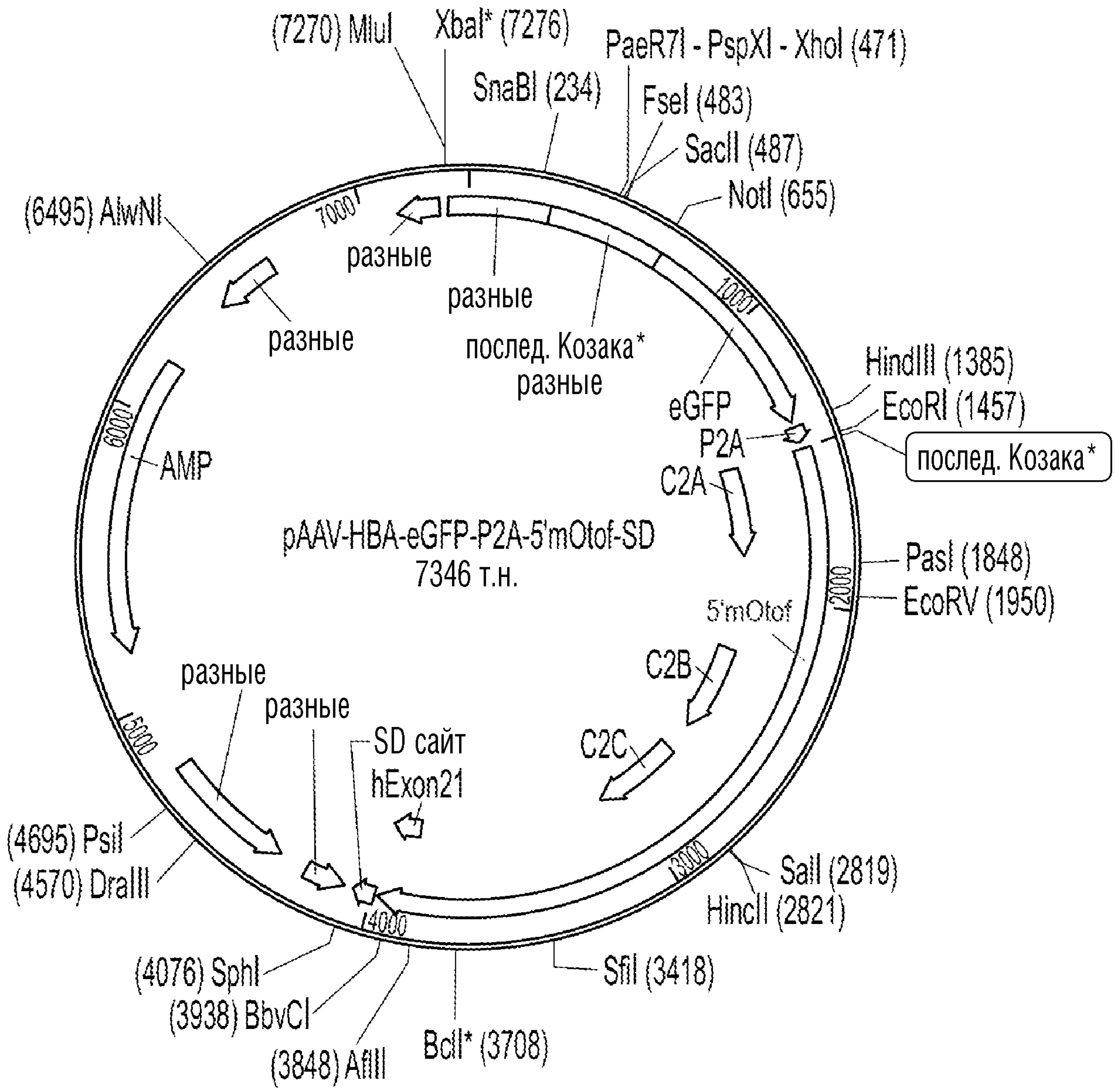
ФИГ.11


(7621) MluI
BspEI (144)
SA сайт
АК послед.
разные
разные
C2D
EcoNI (1057)
AleI (1255)
1000
3'mOtof
AfeI (1632)
AflII (1771)
BsrGI (1925)
PaeR7I - XhoI (1955)
2000
C2E
AarI (2329)
KflI (2370)
C2F
PasI (2701)
3000
AgeI (3104)
AvrII (3531)
Acc65I (3544)
KpnI (3548)
BamHI (3559)
SpeI (3565)
XbaI (3571)
NotI (3578)
(3585) HindIII
(4198) SalI
4000
WPRE
разные
разные
(4921) DraIII
5000
(5193) NdeI
разные
(6144) FspI
6000
AMP
7000
pAAV-AK-SA-3'mOtof-EWB
7625 т.н.

ФИГ.12

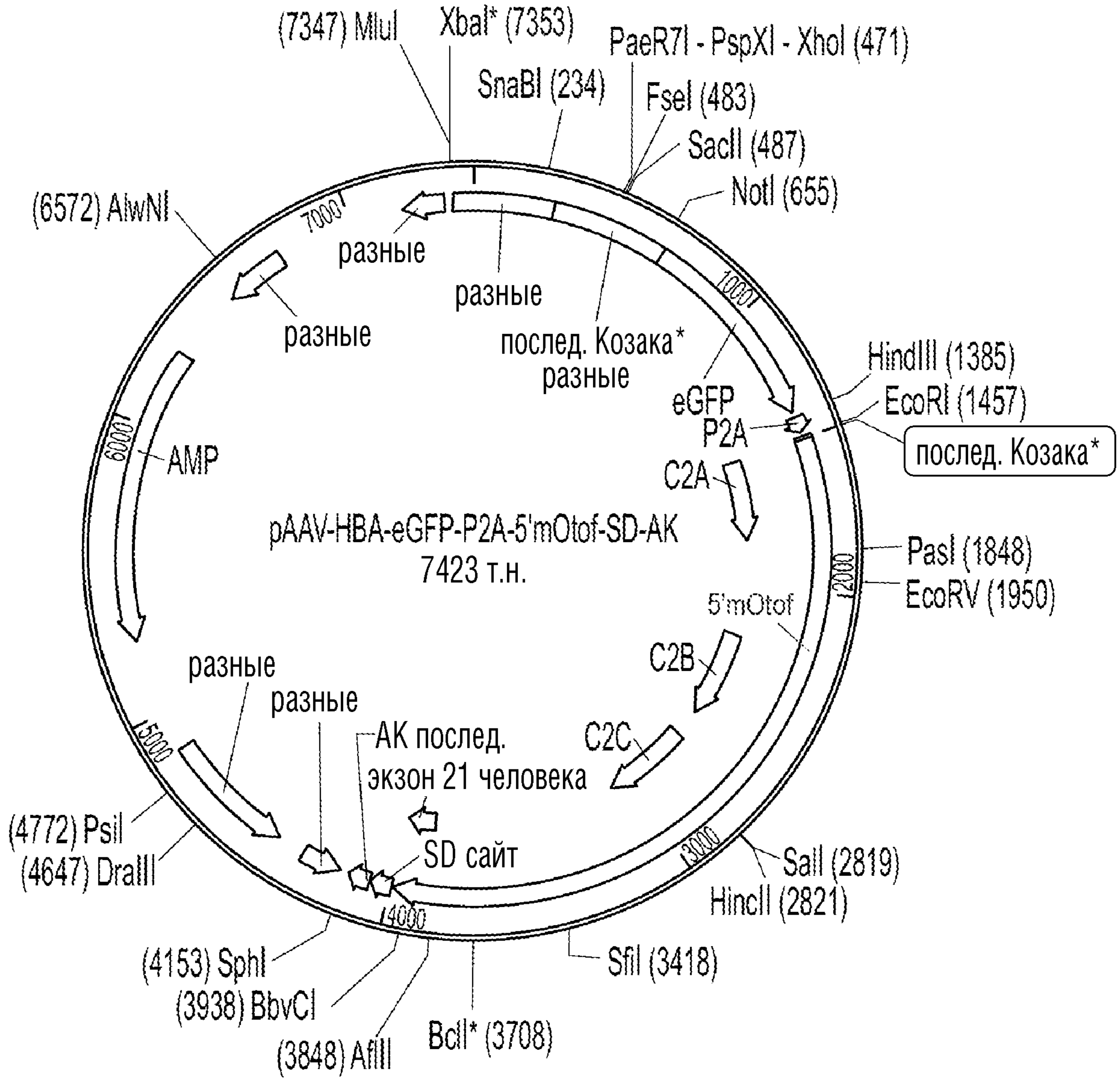

(7544) MluI
BspEI (67)
EcoNI (980)
AleI (1178)
AfeI (1555)
AflII (1694)
BsrGI (1848)
PaeR7I - XhoI (1878)
AarI (2252)
KflI (2293)
PasI (2624)
AgeI (3027)
AvrII (3454)
Acc65I (3467)
KpnI (3471)
BamHI (3482)
SpeI (3488)
XbaI (3494)
NotI (3501)
(3508) HindIII
(4121) SalI
(4844) DraIII
(5116) NdeI
(6144) FspI
SA сайт
разные
разные
C2D
3'mOtof
C2E
C2F
WPRE
AMP
разные
разные
разные
pAAV-SA-3'mOtof-EWB
7548 т.н.
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

ФИГ.13



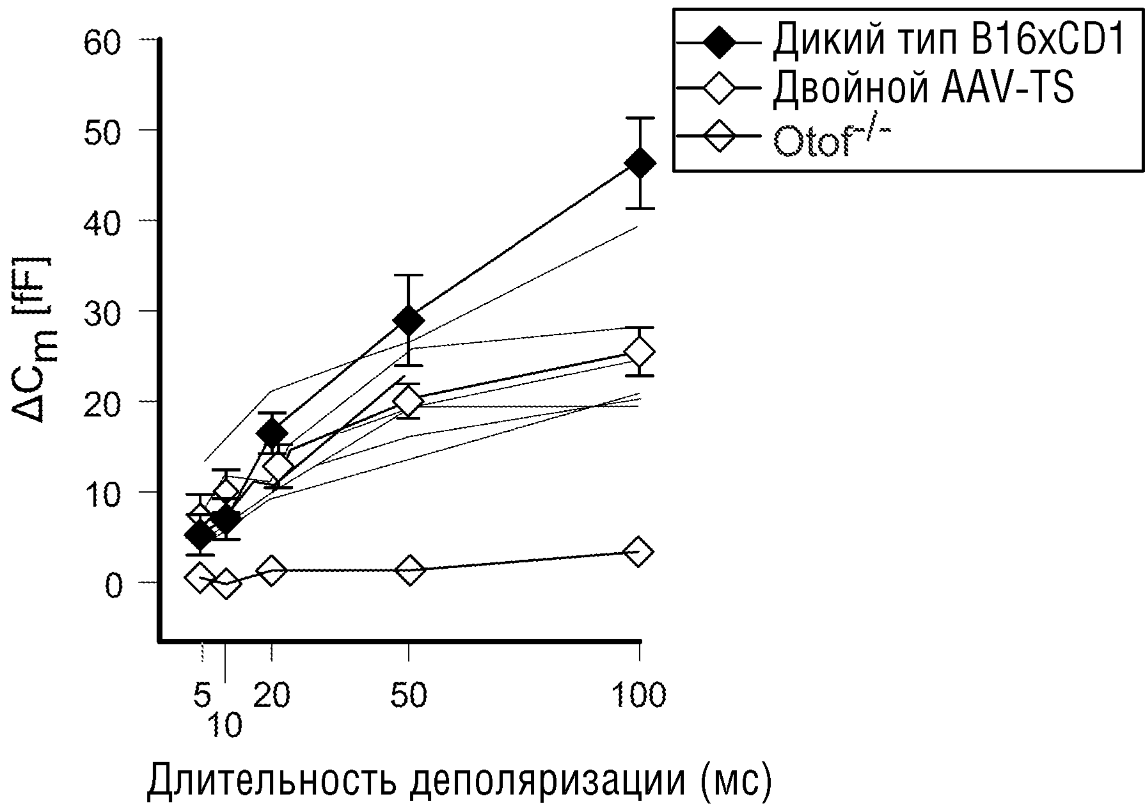
(7270) MluI
XbaI* (7276)
PaeR7I - PspXI - XhoI (471)
SnaBI (234)
FseI (483)
SacII (487)
NotI (655)
(6495) AlwNI
7000
разные
разные
разные
послед. Козака*
разные
1000
HindIII (1385)
EcoRI (1457)
eGFP
P2A
послед. Козака*
C2A
6000
AMP
pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOtof-SD
7346 т.н.
PasI (1848)
2000
EcoRV (1950)
5'mOtof
C2B
разные
разные
SD сайт
hExon21
C2C
5000
(4695) PsiI
(4570) DraIII
3000
SalI (2819)
HincII (2821)
4000
(4076) SphI
(3938) BbvCI
(3848) AflII
BclI* (3708)
SfiI (3418)

ФИГ.14



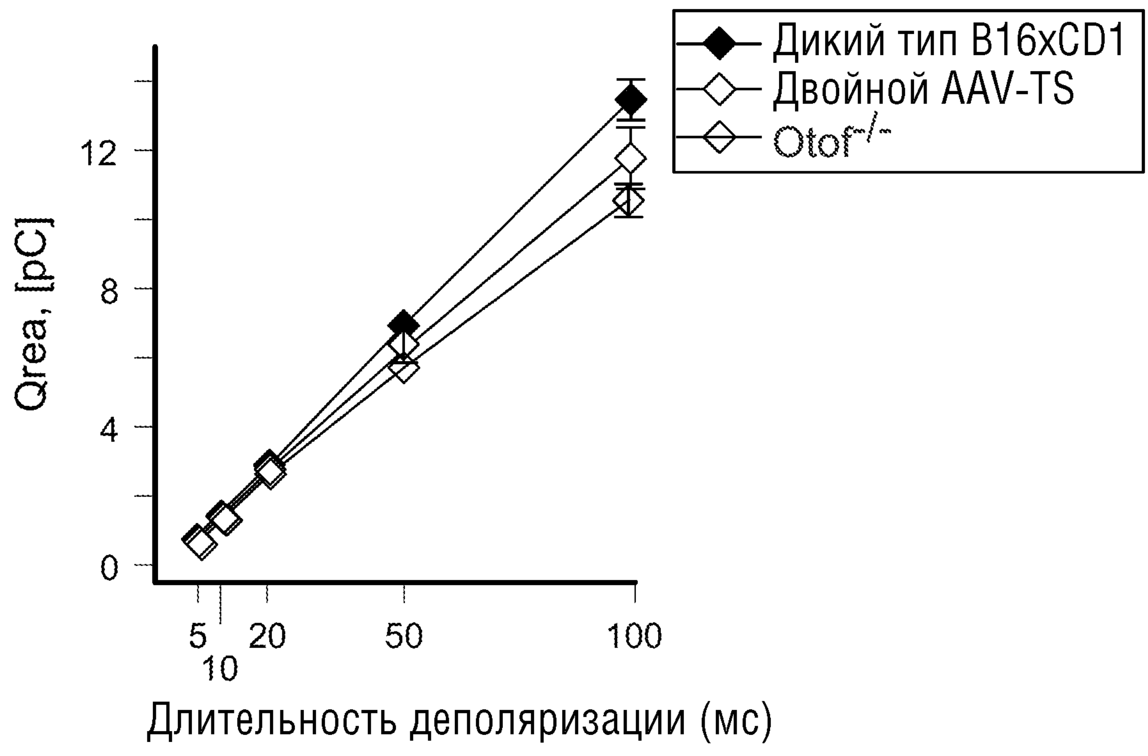
(7347) MluI
XbaI* (7353)
PaeR7I - PspXI - XhoI (471)
SnaBI (234)
FseI (483)
SacII (487)
NotI (655)
(6572) AlwNI
разные
разные
разные
послед. Козака*
разные
eGFP
P2A
HindIII (1385)
EcoRI (1457)
послед. Козака*
C2A
AMP
pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOtof-SD-AK
7423 т.н.
PasI (1848)
EcoRV (1950)
5'mOtof
C2B
разные
разные
AK послед.
экзон 21 человека
C2C
(4772) PsiI
(4647) DraIII
SD сайт
SalI (2819)
HincII (2821)
(4153) SphI
(3938) BbvCI
(3848) AflII
BclI* (3708)
SfiI (3418)

ФИГ.15



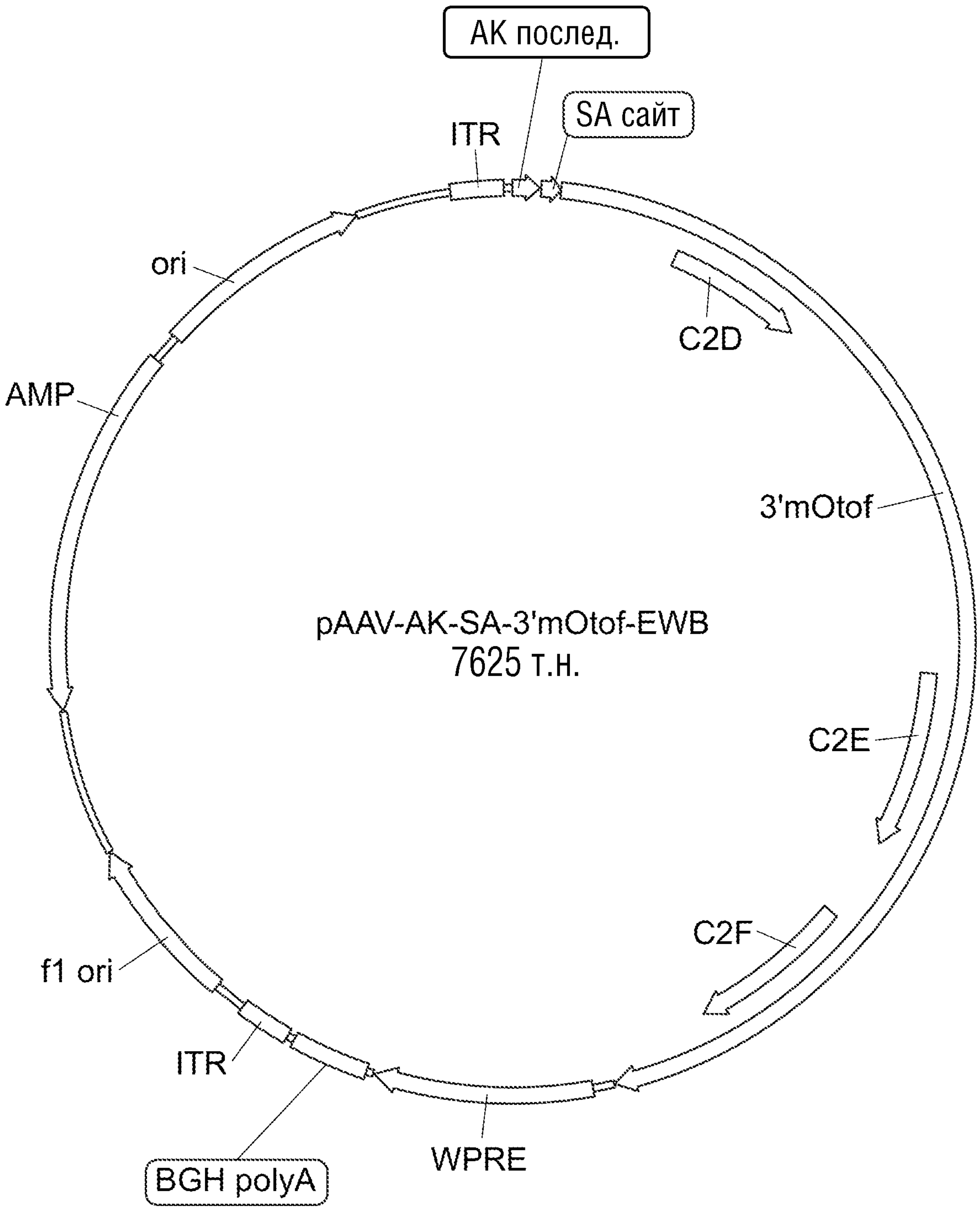
Дикий тип B16xCD1
Двойной AAV-TS
Otof-/-
ΔCm [fF]
60
50
40
30
20
10
0
5
10
20
50
100
Длительность деполяризации (мс)

ФИГ.16

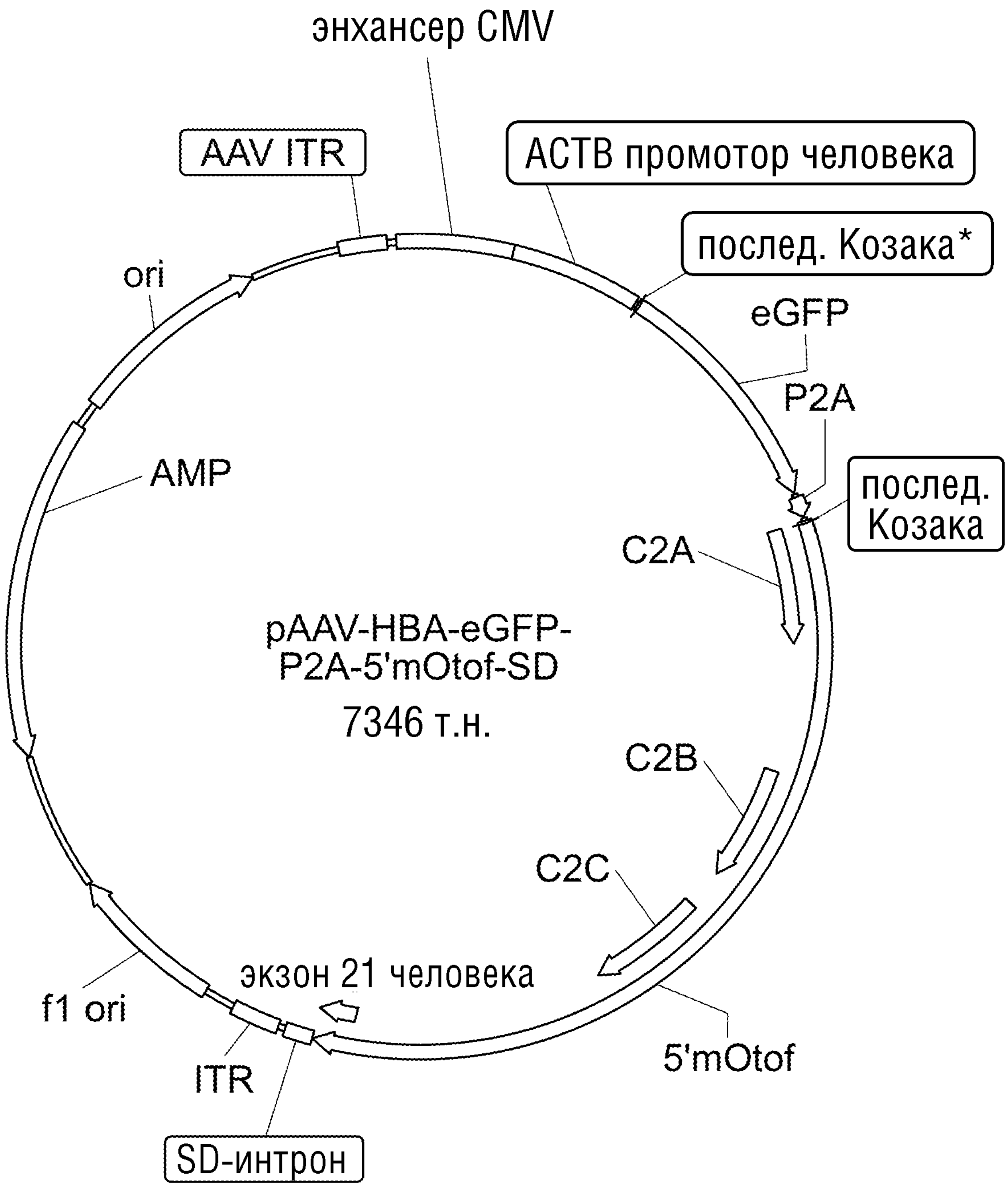


Дикий тип B16xCD1
Двойной AAV-TS
Otof-/-
Qrea, [pC]
12
8
4
0
5
10
20
50
100
Длительность деполяризации (мс)

ФИГ.17

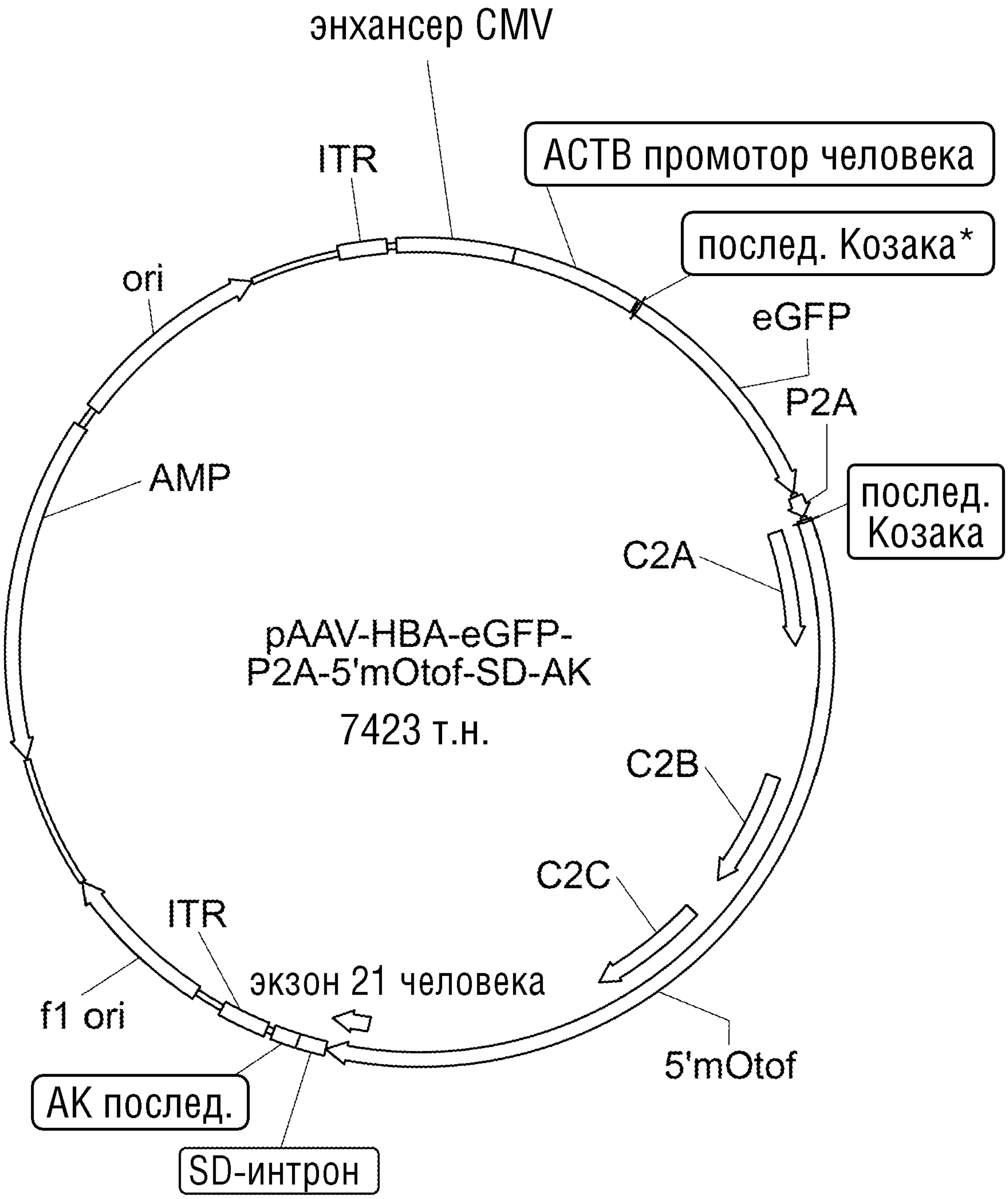

АК послед.
SA сайт
ITR
ori
C2D
AMP
3'mOtof
pAAV-AK-SA-3'mOtof-EWB
7625 т.н.
C2E
C2F
f1 ori
ITR
BGH polyA
WPRE

ФИГ.18

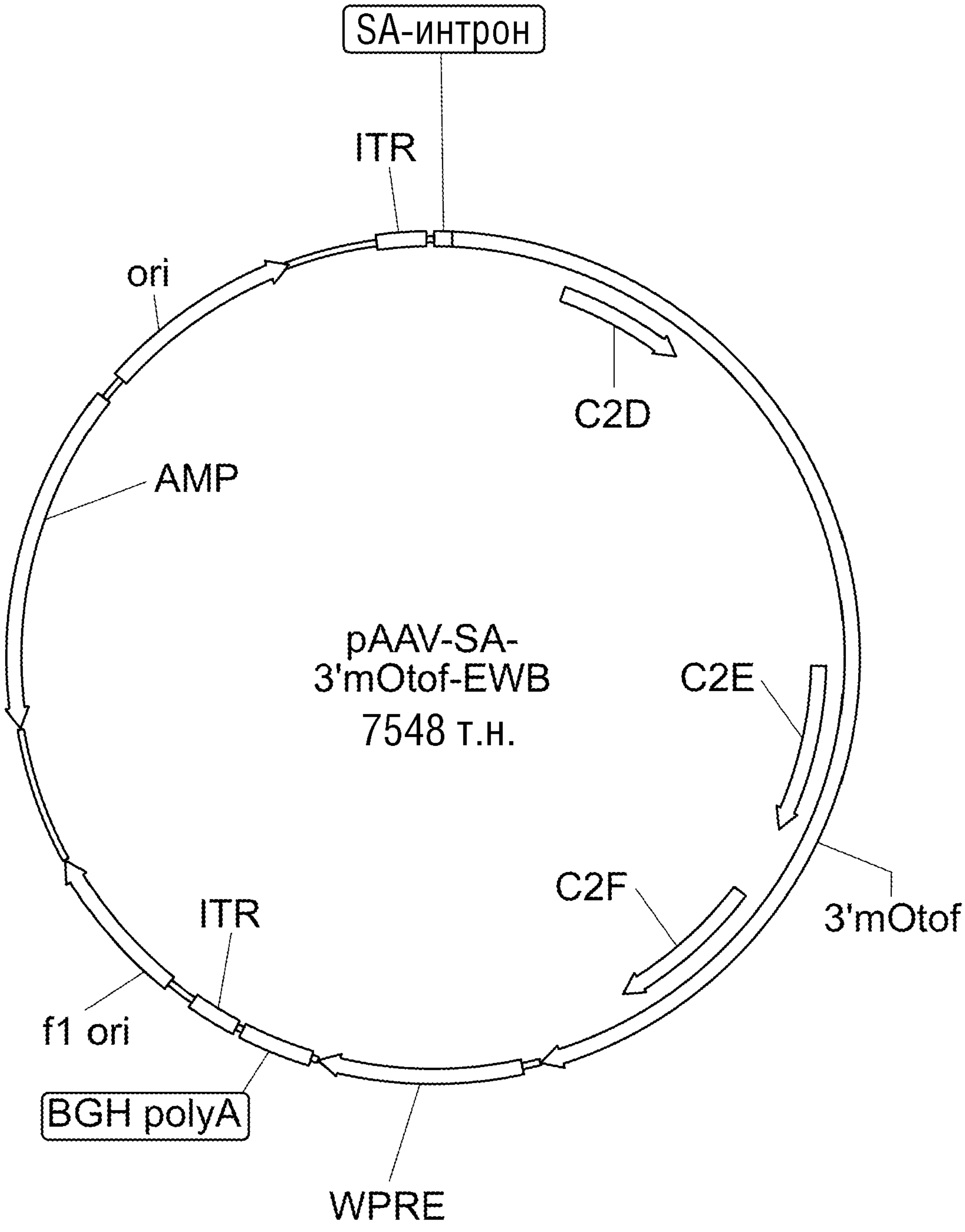


энхансер CMV
AAV ITR
ACTB промотор человека
послед. Козака*
ori
eGFP
P2A
AMP
послед. Козака
C2A
pAAV-HBA-eGFP-P2A-5'mOtof-SD
7346 т.н.
C2B
C2C
экзон 21 человека
f1 ori
5'mOtof
ITR
SD-интрон

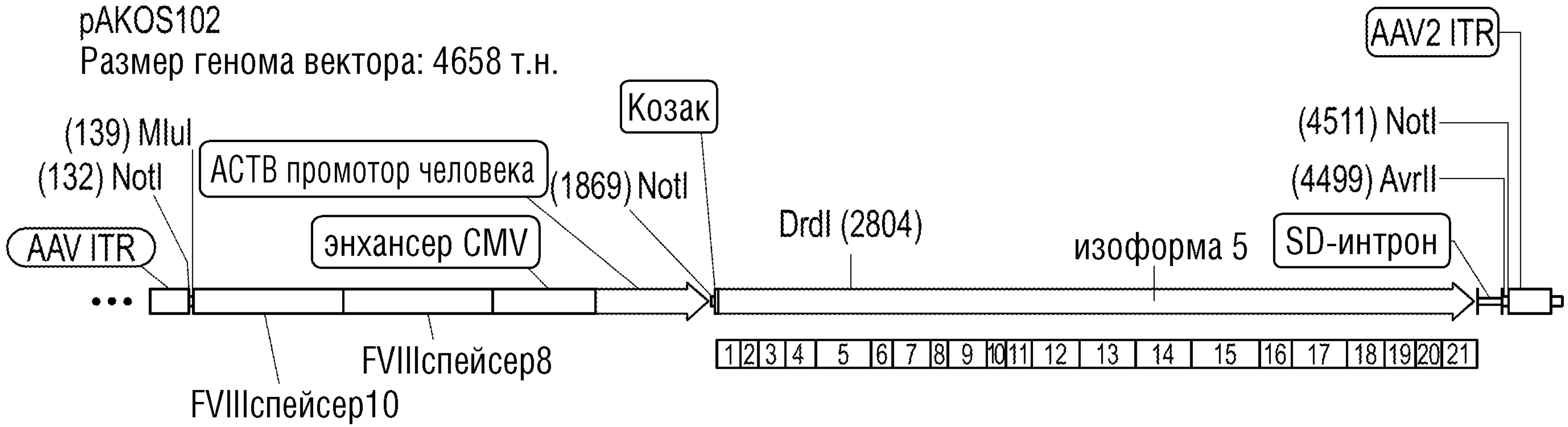
ФИГ.19


энхансер CMV
ITR
ACTB промотор человека
послед. Козака*
ori
eGFP
P2A
AMP
послед. Козака
C2A
pAAV-HBA-eGFP-
P2A-5'mOtof-SD-AK
7423 т.н.
C2B
C2C
ITR
экзон 21 человека
f1 ori
5'mOtof
AK послед.
SD-интрон

ФИГ.20

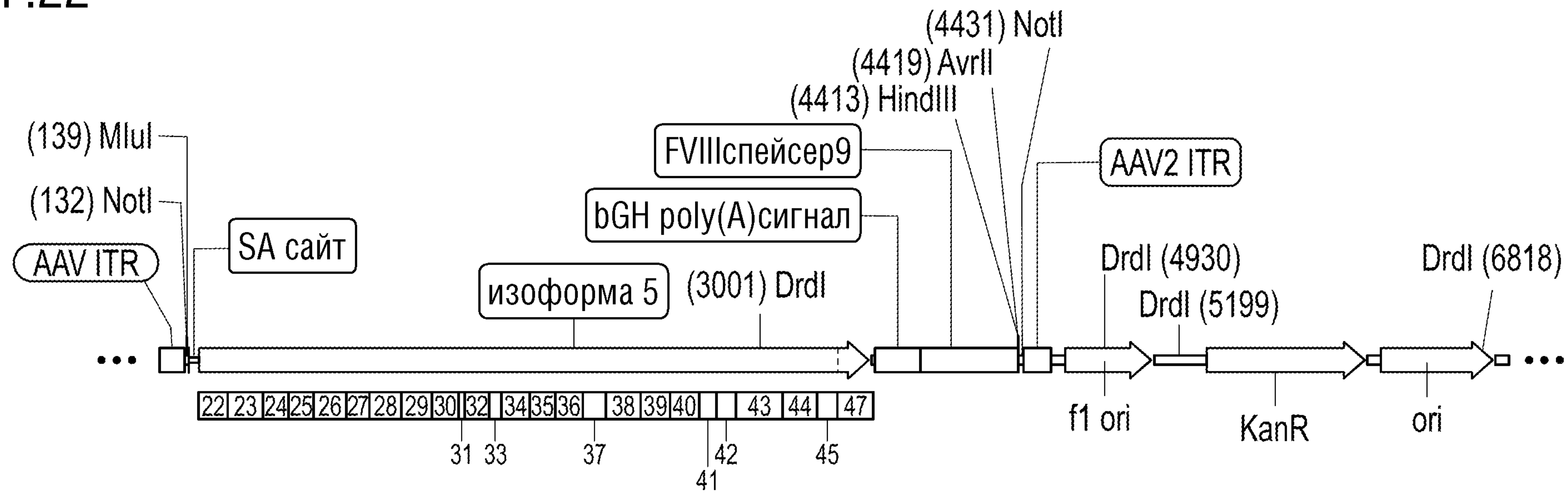

SA-интрон
ITR
ori
C2D
AMP
pAAV-SA-
3'mOtof-EWB
7548 т.н.
C2E
3'mOtof
C2F
ITR
f1 ori
BGH polyA
WPRE

ФИГ.21



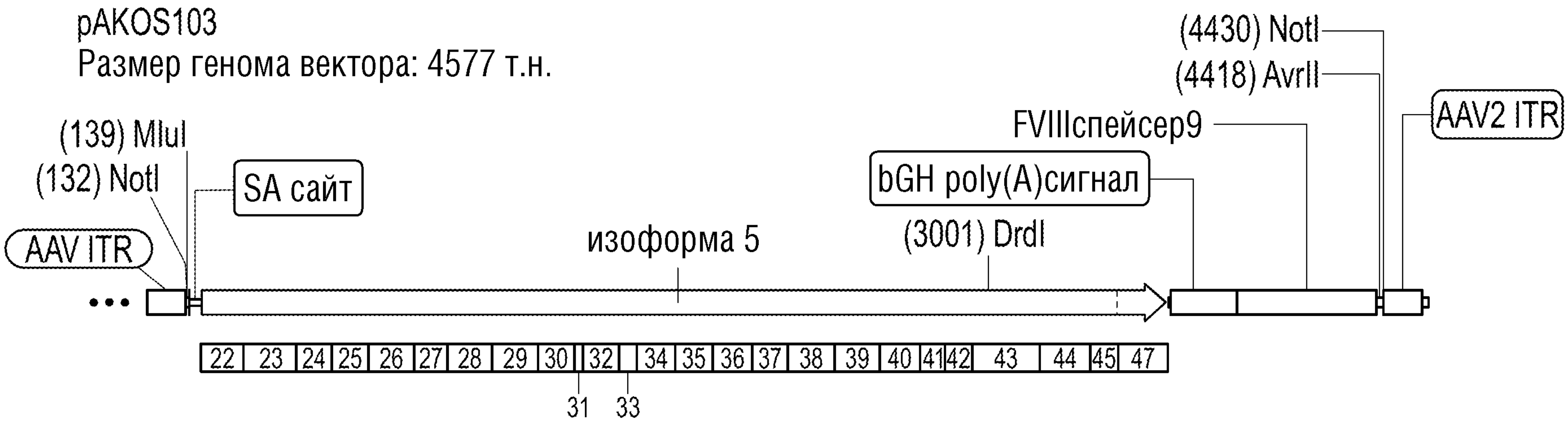
pAKOS102
Размер генома вектора: 4658 т.н.
(139) MluI
(132) NotI
AAV ITR
ACTB промотор человека
энхансер CMV
(1869) NotI
Козак
DrdI (2804)
изоформа 5
SD-интрон
(4511) NotI
(4499) AvrII
AAV2 ITR
FVIIIспейсер8
FVIIIспейсер10
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

ФИГ.22

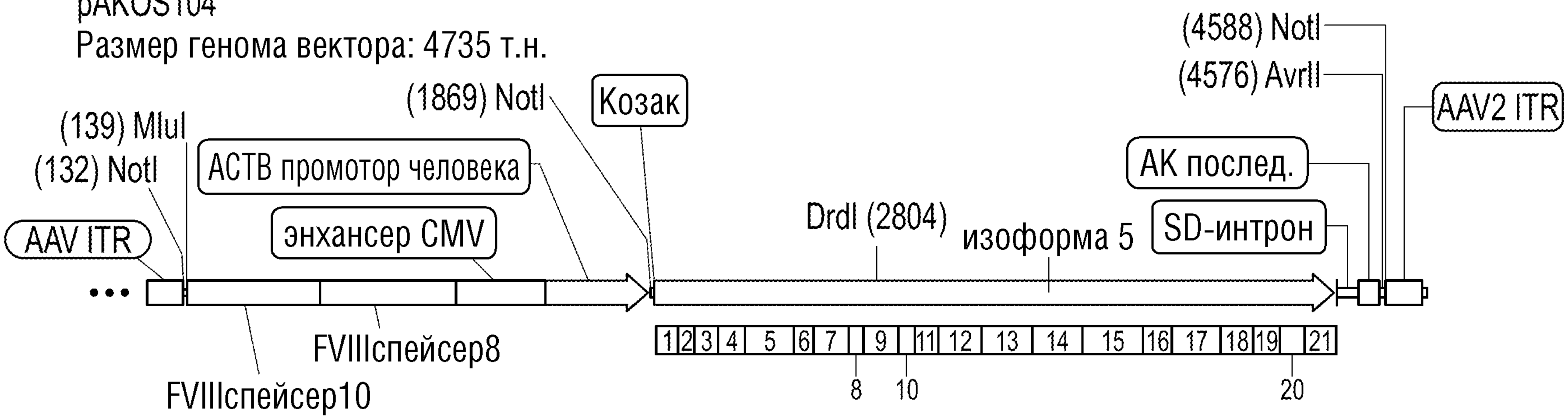


(139) MluI
(132) NotI
AAV ITR
SA сайт
изоформа 5
(3001) DrdI
bGH poly(A)сигнал
FVIIIспейсер9
(4413) HindIII
(4419) AvrII
(4431) NotI
AAV2 ITR
DrdI (4930)
DrdI (5199)
DrdI (6818)
f1 ori
KanR
ori
22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 34 35 36 38 39 40 43 44 47
31 33 37 41 42 45

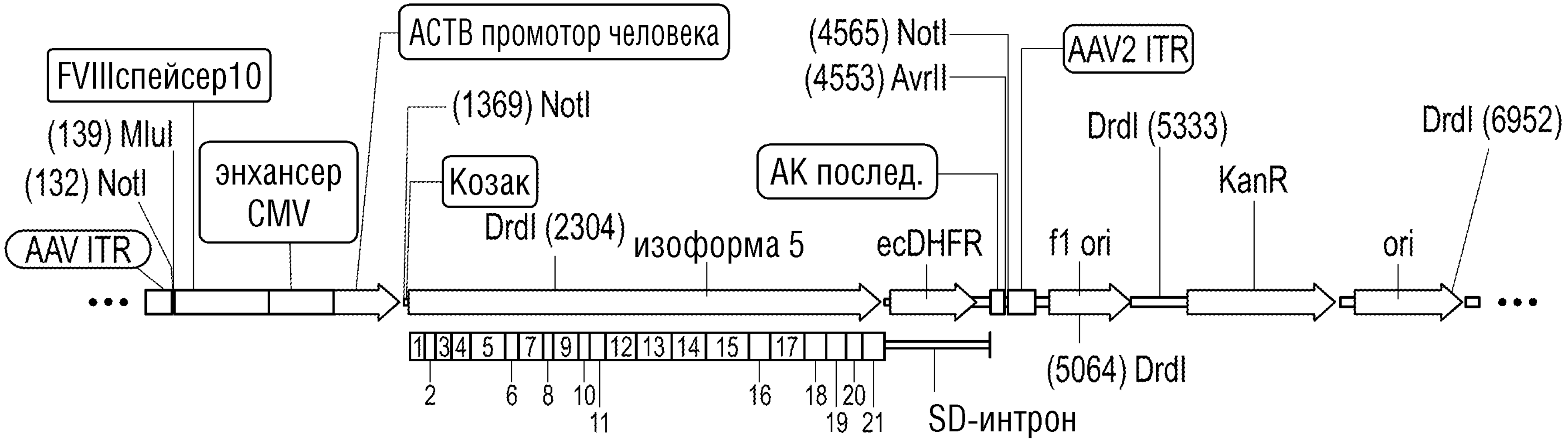
ФИГ.23


pAKOS103
Размер генома вектора: 4577 т.н.
(4430) NotI
(4418) AvrII
FVIIIспейсер9
AAV2 ITR
bGH poly(A)сигнал
(139) MluI
(132) NotI
SA сайт
AAV ITR
изоформа 5
(3001) DrdI
22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 47
31 33

ФИГ.24

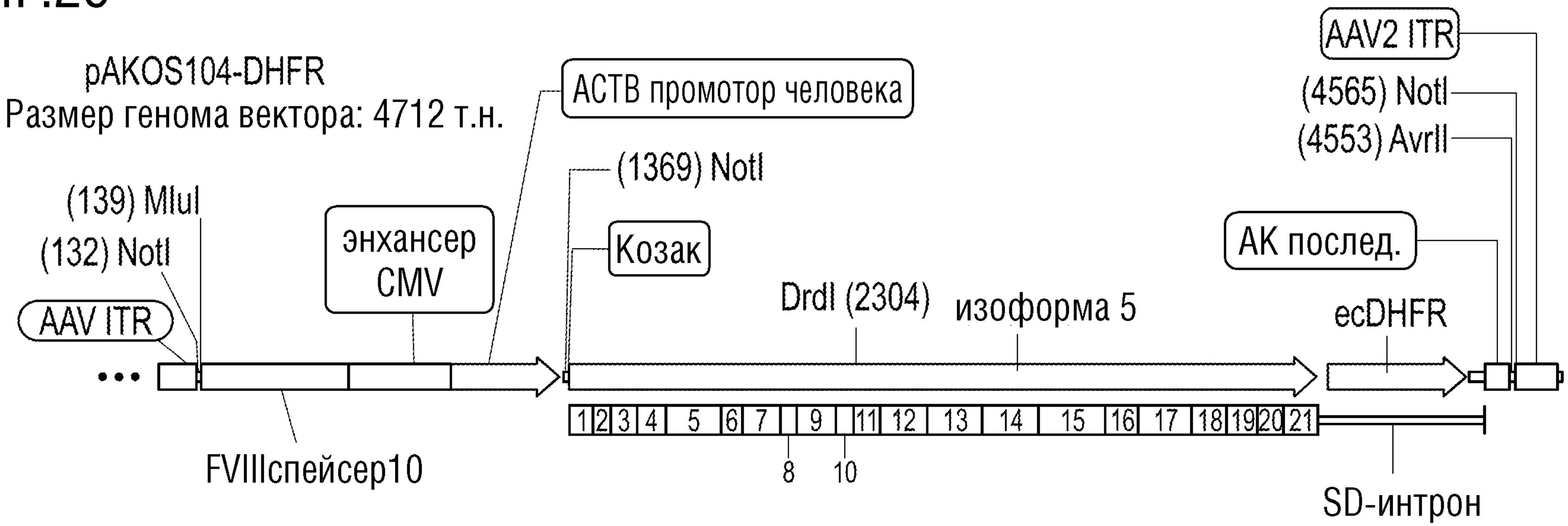

pAKOS104
Размер генома вектора: 4735 т.н.
(4588) NotI
(4576) AvrII
AAV2 ITR
(1869) NotI
Козак
(139) MluI
(132) NotI
ACTB промотор человека
AK послед.
AAV ITR
энхансер CMV
DrdI (2804)
изоформа 5
SD-интрон
1 2 3 4 5 6 7 9 11 12 13 14 15 16 17 18 19 21
8 10 20
FVIIIспейсер8
FVIIIспейсер10

ФИГ.25

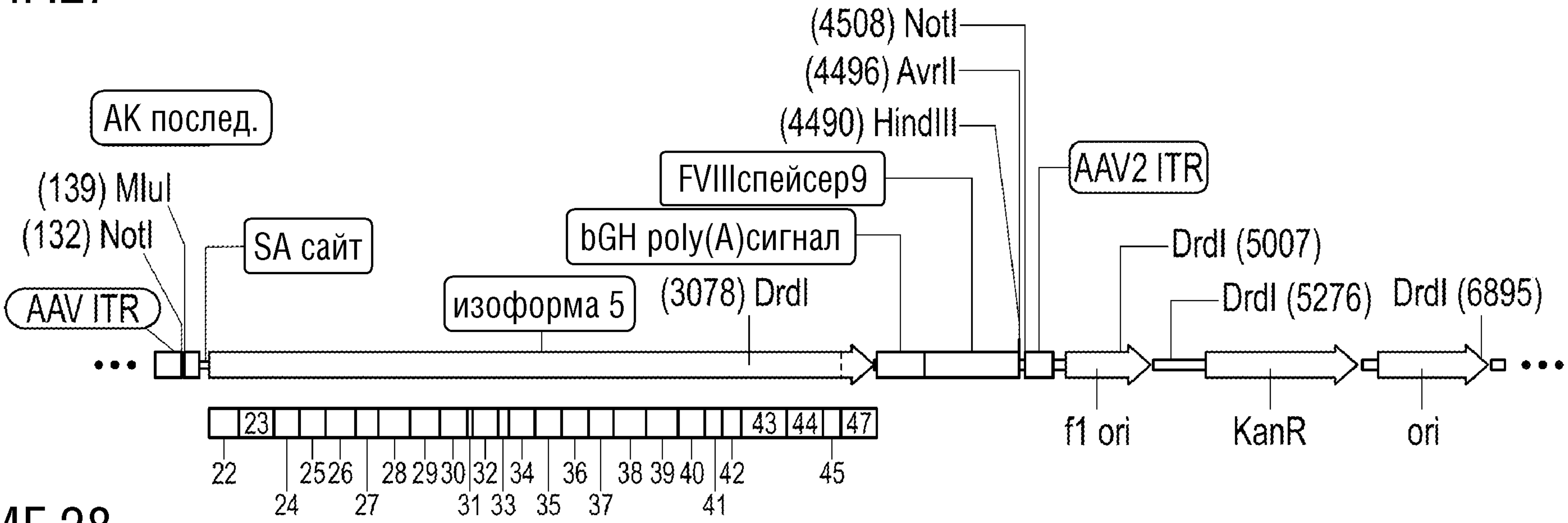


ФИГ.26

pAKOS104-DHFR
Размер генома вектора: 4712 т.н.

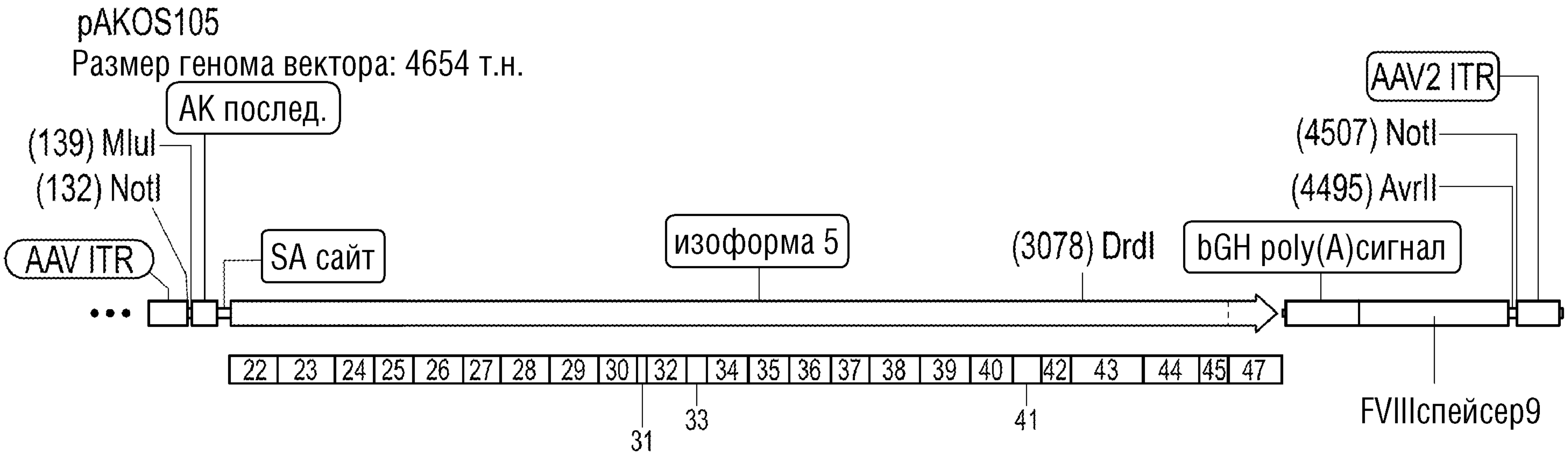


ФИГ.27



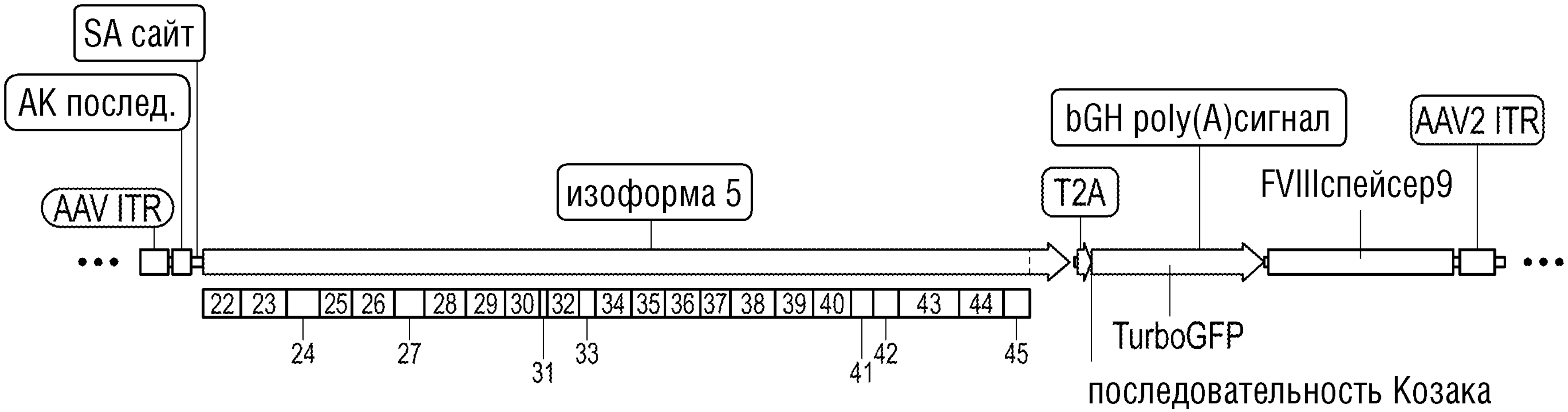
(4508) NotI
(4496) AvrII
(4490) HindIII
AAV2 ITR
FVIIIспейсер9
АК послед.
(139) MluI
(132) NotI
SA сайт
bGH poly(A)сигнал
DrdI (5007)
DrdI (5276)
DrdI (6895)
AAV ITR
изоформа 5
(3078) DrdI
23 43 44 47
22 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 45
f1 ori
KanR
ori

ФИГ.28

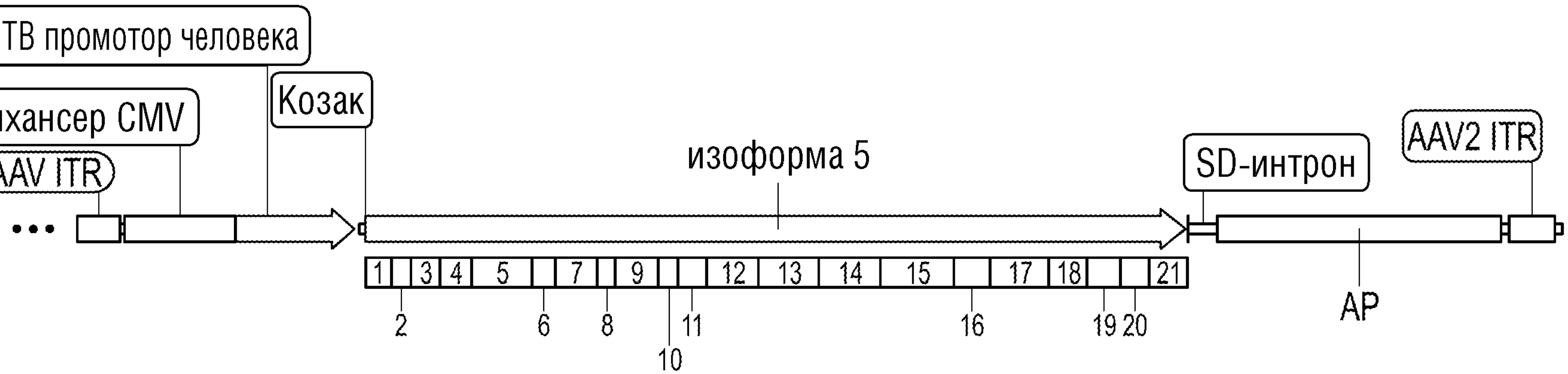


pAKOS105
Размер генома вектора: 4654 т.н.
АК послед.
AAV2 ITR
(4507) NotI
(4495) AvrII
(139) MluI
(132) NotI
AAV ITR
SA сайт
изоформа 5
(3078) DrdI
bGH poly(A)сигнал
22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 34 35 36 37 38 39 40 42 43 44 45 47
31
33
41
FVIIIспейсер9

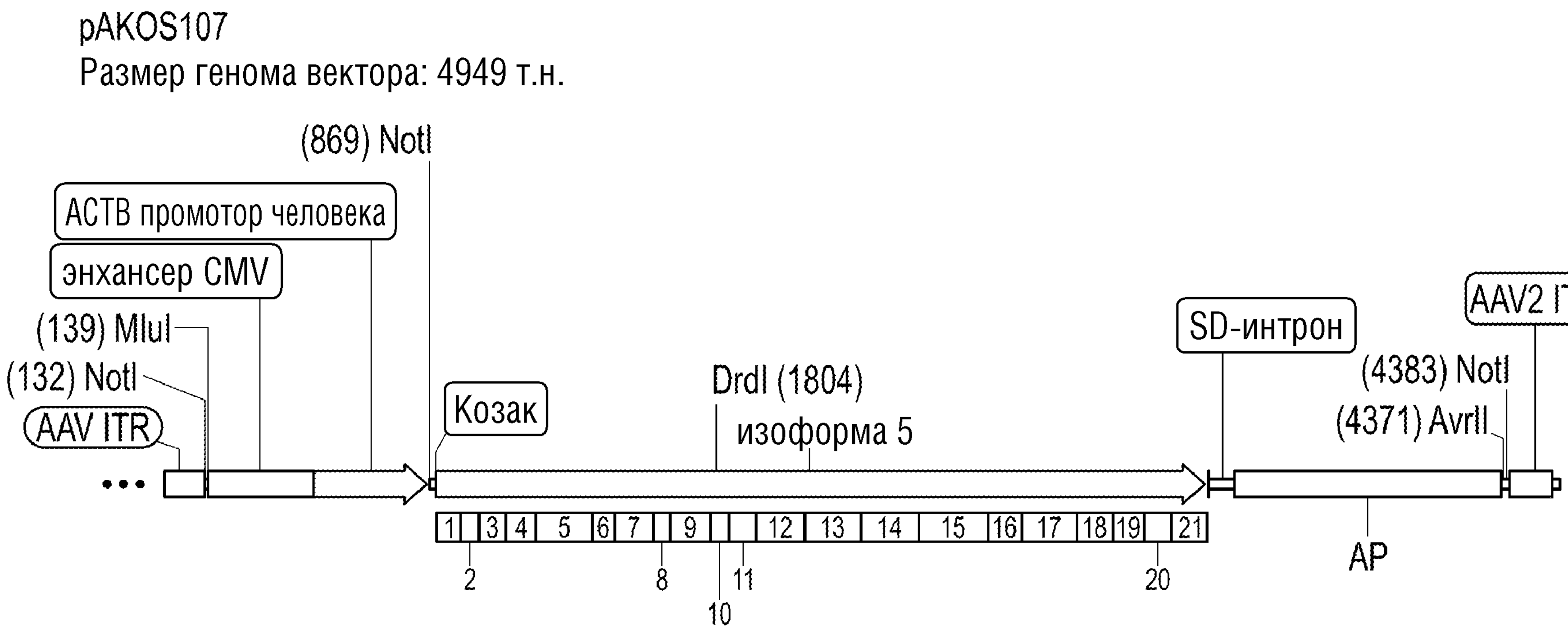
ФИГ.29


SA сайт
AK послед.
AAV ITR
изоформа 5
T2A
bGH poly(A)сигнал
FVIIIспейсер9
AAV2 ITR
22 23 25 26 28 29 30 32 34 35 36 37 38 39 40 43 44
24 27 31 33 41 42 45
TurboGFP
последовательность Козака

ФИГ.30

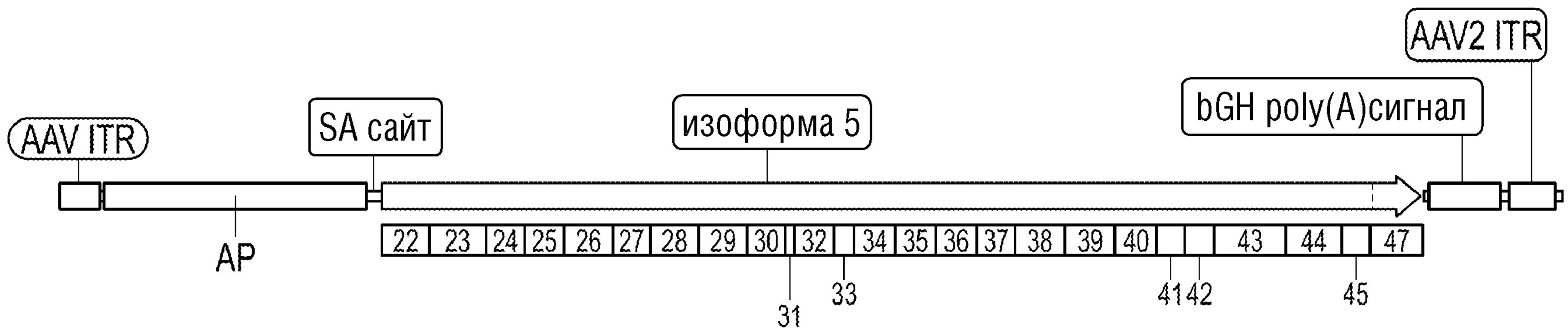

ACTB промотор человека
энхансер CMV
Козак
AAV ITR
изоформа 5
SD-интрон
AAV2 ITR
1 3 4 5 7 9 12 13 14 15 17 18 21
2 6 8 10 11 16 19 20
AP

ФИГ.31



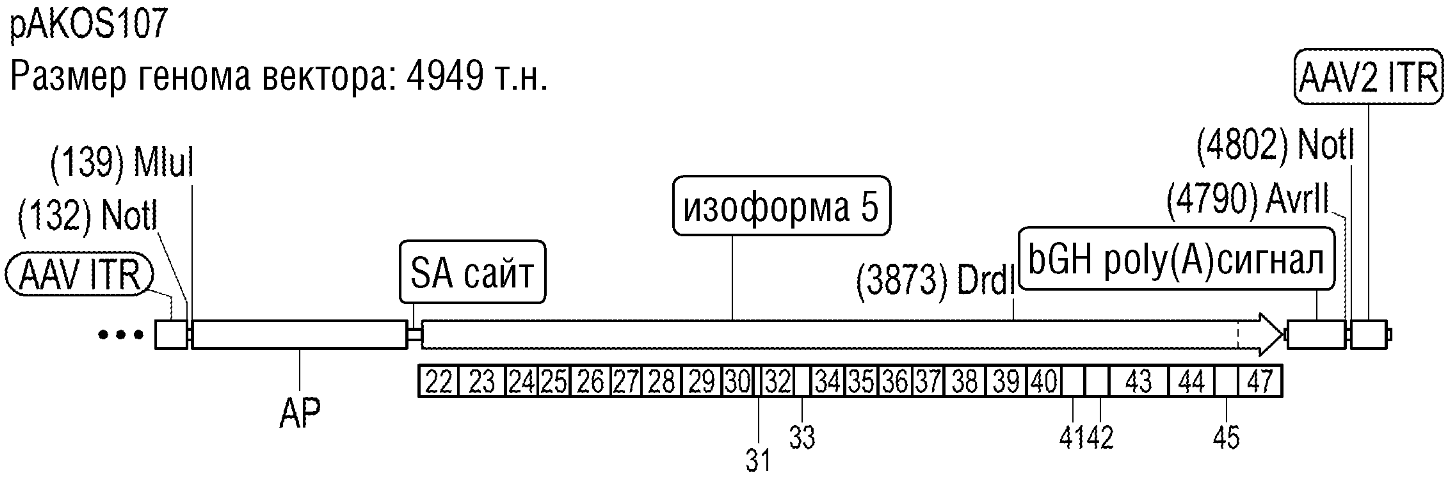
pAKOS107
Размер генома вектора: 4949 т.н.
(869) NotI
ACTB промотор человека
энхансер CMV
(139) MluI
(132) NotI
AAV ITR
Козак
DrdI (1804)
изоформа 5
SD-интрон
(4383) NotI
(4371) AvrII
AAV2 ITR
AP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

ФИГ.32

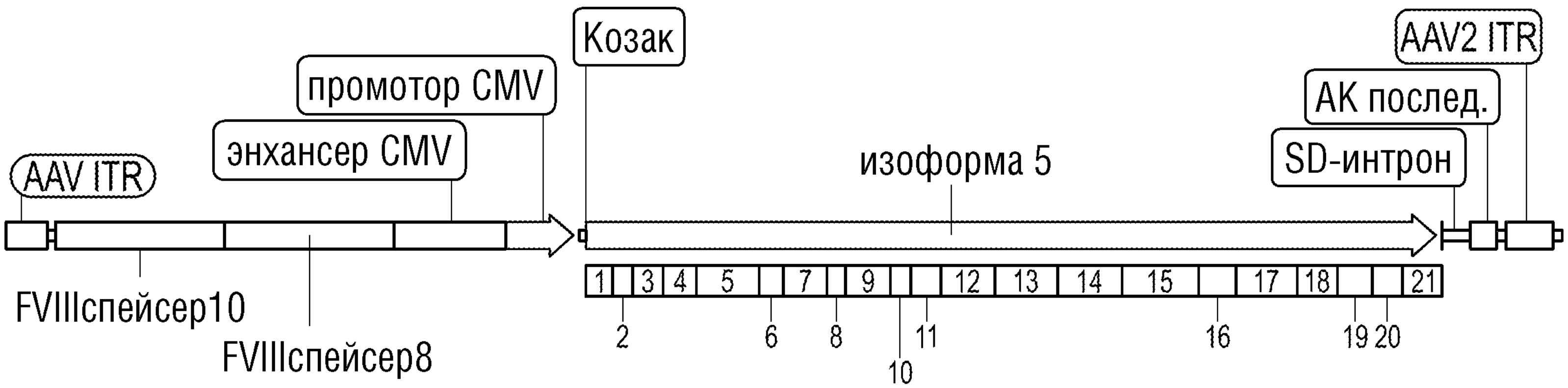


AAV ITR
AP
SA сайт
изоформа 5
bGH poly(A)сигнал
AAV2 ITR
22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 47

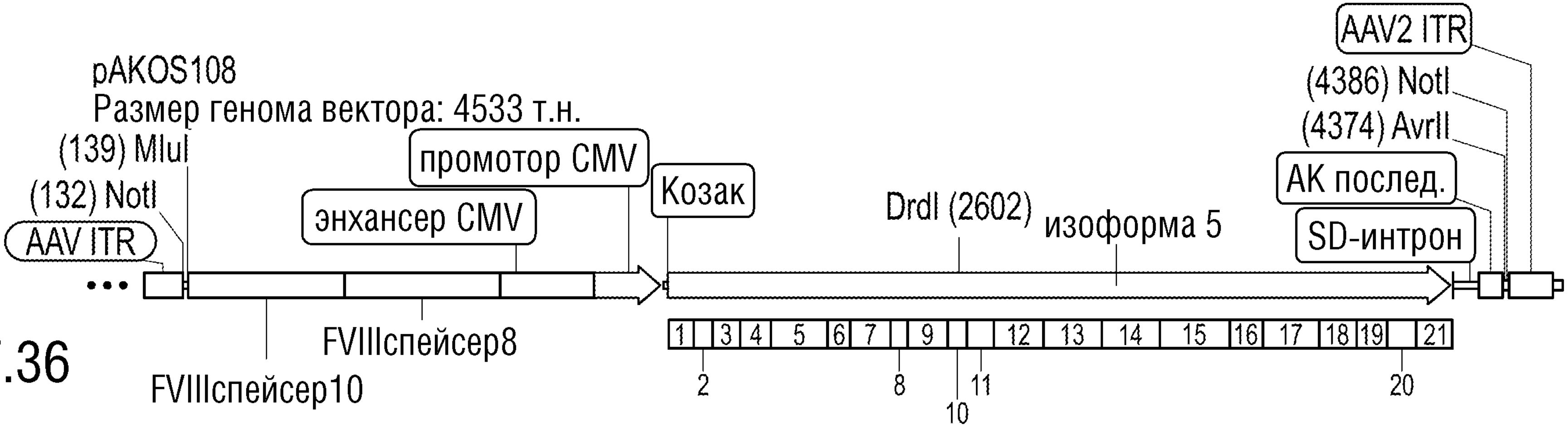
ФИГ.33


pAKOS107
Размер генома вектора: 4949 т.н.
AAV ITR
(132) NotI
(139) MluI
AP
SA сайт
изоформа 5
(3873) DrdI
bGH poly(A)сигнал
(4790) AvrII
(4802) NotI
AAV2 ITR
22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 34 35 36 37 38 39 40 43 44 47
31 33 41 42 45

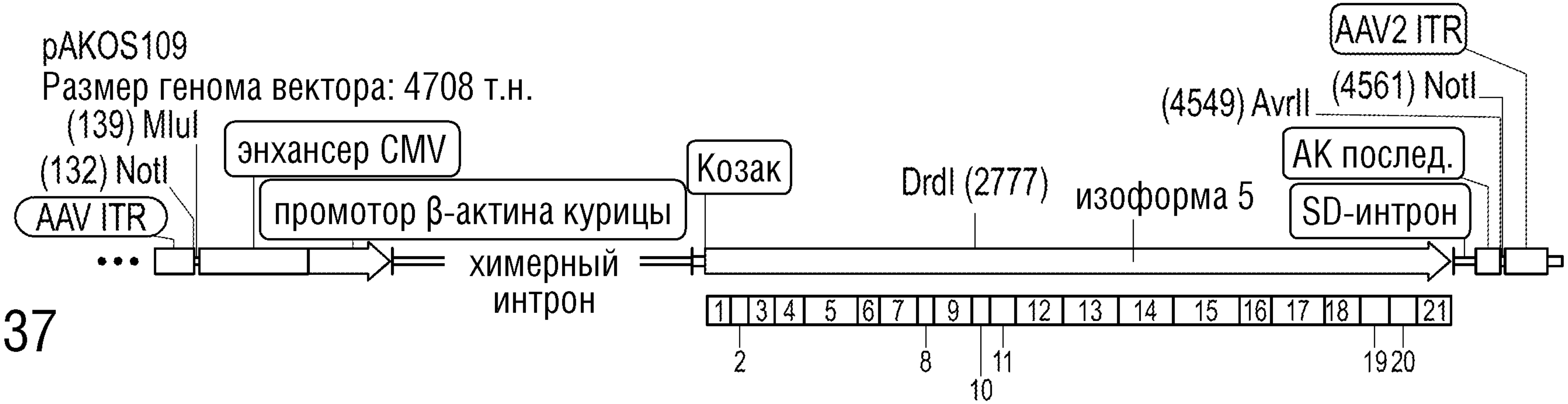
ФИГ.34


AAV ITR
энхансер CMV
промотор CMV
Козак
изоформа 5
SD-интрон
AK послед.
AAV2 ITR
FVIIIспейсер10
FVIIIспейсер8
1 3 4 5 7 9 12 13 14 15 17 18 21
2 6 8 10 11 16 19 20

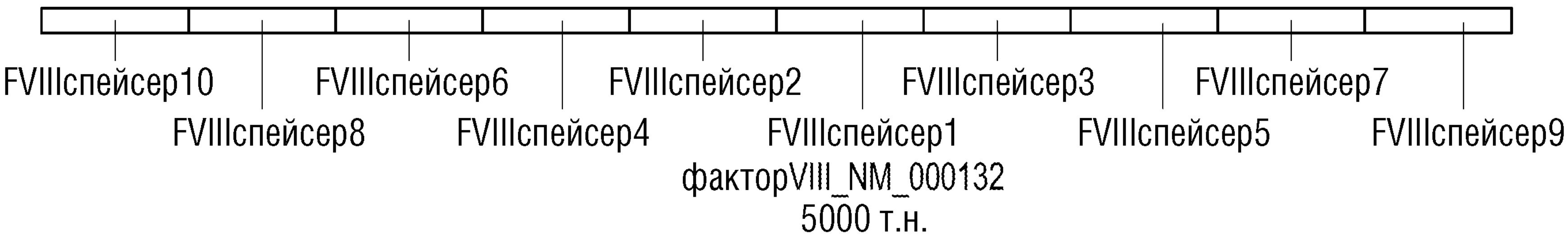
ФИГ.35



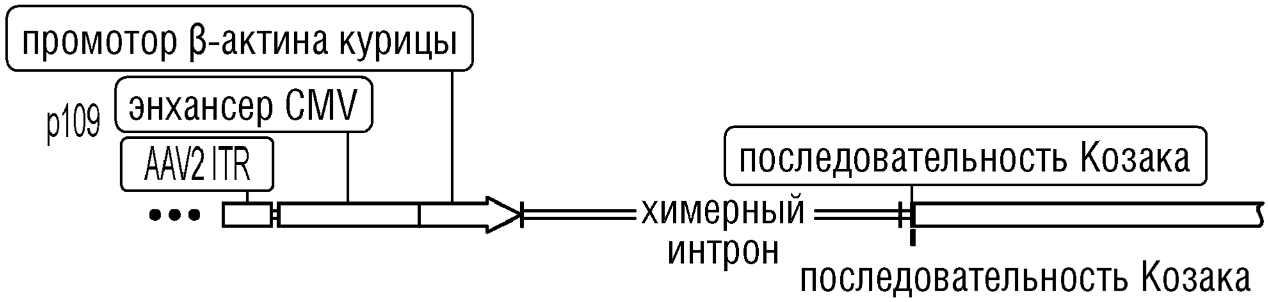
ФИГ.36



ФИГ.37



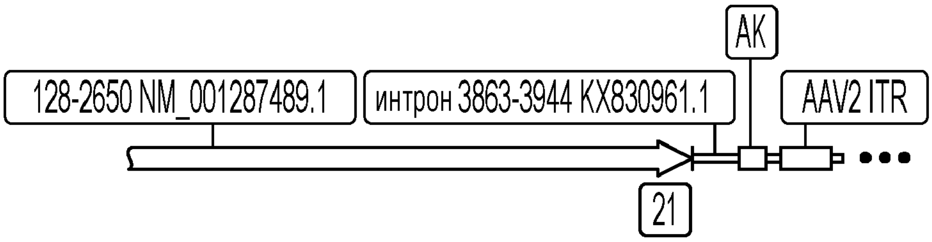
ФИГ.38



CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTC
ACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTA
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC
CCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGG
CGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA
CCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT
AAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAG
GTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAA
GGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTG
GGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCG
CTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAG
CCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGG
TTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGGCCTTGCTCATCCACCTCAAG
ACTCTCGGGTCCTGGAGAACTGTGAGGATGTGGCTGACTTTGATGAGACATTTCGGTGGCCGGTGGCCAGCAGC
CGGGACCTTCCGCATGGTGCTGCAGAAGGTGGTAGAGGAGAGCCATGTGGAGGTGACTGACACGCTGATTGATG
TGGGCTCCTGGGACGATGGGGACTTCCTGGGAGATGAGTCTCTTCAAGAGGAAGAGAAGGACAGCCAAGAGACG
CGGGAGGAGCGTGTTCTCCGCCATGAAGCTCGGCAAAAACAGGTCTCACAAGGAGGAGCCCCAAAGACCAGATG
CCGACTCGGTGTCTCTAGCCTCAGTCACAGCTCTCACCACTAATGTCTCCAACAAGCGATCTAAGCCAGACATT
AGCTGGTGGGCTTGAACATGGACCCTGTGGTGTGCGTGGAGGTGGGTGACGACAAGAAGTACACATCCATGAAG
GTTTGACAAGATCATCAAGATTTCGGTGATTCACTCCAAGAACCTGCTGCGCAGTGGCACCCTGGTGGGCTCCT
TCTGACCCCGATGACATCTCCTCGGGGCTGAAGGGCTACGTGAAGTGTGACGTTGCCGTGGTGGGCAAAGGGGA
CCCCGAGGGGGTGCCCCCCGAACGCCAGTGGGCCCGGTTCTATGTGAAAATTTACCGAGCAGAGGGGCTGCCCC
ACCCCTACGTGCAAGTCTTCTTTGCTGGCCAGAAGGGCAAGACTTCAGTGCAGAAGAGCAGCTATGAGCCCCTG
AGACTCGGACAAGGTCAACGACGTGGCCATCGGCACCCACTTCATTGACCTGCGCAAGATTTCTAATGACGGAG
GCTGCTGGATGAGCATCAGGACCTGAACGAGGGCCTGGGGGAGGGTGTGTCCTTCCGGGCCCGGCTCCTGCTGG
GAGCAGGCCACGCCCATCTCGGAGAGCTGTGCAGGTAAAATGGAAGAATTCTTTCTCTTTGGAGCCTTCCTGGA
GGAACGAAGTTGATGGCCTGTCCCGGCCCCAGCGGCCTCGGCCCCGGAAGGAGCCGGGGGATGAGGAAGAAGTA
CACTCCACCAATGCGGCCCCAGGTCACCGACAGGAACTACTTCCATCTGCCCTACCTGGAGCGAAAGCCCTGCA
TGCCGACAAGCTGGAAGAAGGCCTGAACGACATACAGGAGATGATCAAAACGGAGAAGTCCTACCCTGAGCGTC
ACCAGGGCCACTCATCCCGCACCAGGCTTGACCGGGAGCGCCTCAAGTCCTGCATGAGGGAGCTGGAAAACATG
TGTGCCAGAACTTCCTGCAGAAGCTGCGCTTCCTGGCGGACGAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAA
CGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATAAGCTTGAATTCA
GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG

ITR CBA 5'OTOF Донор сплайсинга

ФИГ.38 (продолжение)



AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGC
GAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA
CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
GGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGG
AAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCG
CCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTA
CGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTT
CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTC
CGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGC
AGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTC
CGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGT
GTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCT
ACAGTCTCGGAGCTGCGGGGCAGGGGCGACCGGATCGCCAAAGTGACTTTCCGAGGGCAATCCTTCT
ATCGACAGAAATGAGATGCTGGAGATTCAGGTTTTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGCAACAAGCTCAT
ACAACAATGCTATCATCAAGACCAGCCTGTGCGTGGAGGTCCGGTATCAGGCCACTGACGGCACAG
GATGGACTGCTCCCAGGCTCCCGGCCCAGCTCCCGGCCCCCAGGAGAGAAGAGCTTCCGGAGAGC
AACCGGCGGTGCTGGAGATGGAAGACCTTGACCATCTGGCCATTCGGCTAGGAGATGGACTGGATC
AAGATGGAGCCAAGTGCTGGGCGGCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCACGGTGATCGAGGCCCGGC
GAGTCCACTAACTGCCCCTATTACAACGAGTACTTCGTCTTCGACTTCCATGTCTCTCCGGATGTCAT
TCAAAATGGACGTGGGAACCGTGTACTCGCAGCCAGAGCACCAGTTCCATCACAAGTGGGCCATCCTG
CAACATCAAGACGCCCCACAAGGCCAATGAGACCGACGAAGATGACATTGAGGGGAACTTGCTGCT
GTATGAACACAAGCCTCATGGCCAATGTAAAGAAGGCTTTCATCGGTGAAAACAAGGACCTCGTGG
TGGAATGAGCAGGTCGTCTTTACAGACCTCTTCCCCCCACTCTGCAAACGCATGAAGGTGCAGATCCG
ACAAAGGCTTCCTGCCCACACTGGGCCCAGCCTGGGTGAACATGTACGGCTCCACACGTAACTACAC
GCCTGGCTGTGGAGATCGTAGACACCTCCAACCCTGAGCTCACCAGCTCCACAGAGGTGCAGGTG
GGCCTCAATGATCGACCGGAGAAACGGAGACAAGCCCATCACCTTTGAGGTCACCATAGGCAACTATG
GACCTGATTCAGAACGCAAGTGATGACGAGGCCGGTGATGCCGGGGACCTGGCCTCAGTCTCCTC
TCTACATCAAGAGCTGGTGGCCGGACCAGCGCCGCCGCCTCTACAATGCCAACATCATGGACCACAT
GCCTGCGGGGCGTCCTGGAGGAGCTGAGCTGTGGCTGCTGCCGCTTCCTCTCCCTCGCTGACAAGG
GGGCAGCAGGCCAGGATGCTGCGGGCCCAGGTGAAGCGGCACACGGTGCGGGACAAGCTGAGGC
GGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGGGATTTTGCCGATTT
GCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
CGCGCAGCTGCCTGCAGG

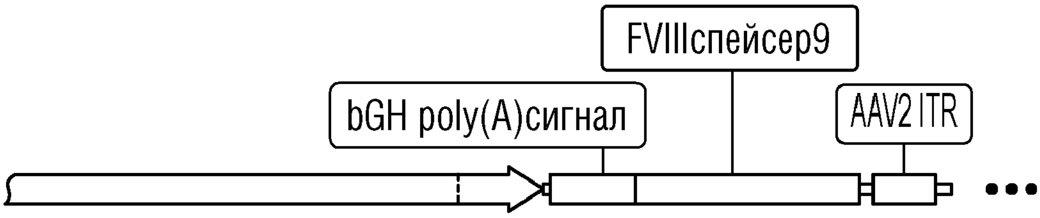
AK F1 рекомбинация

ФИГ.39

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTC
CGCGTGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACA
TTCCCGACATCTTCATCTGGATGATGAGCAACAACAAGCGTGTCGCCTATGCCCGTGTGCCCTCCAAGGACCTGCT
GCCAGGGAAGCGGGGCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGTGCAGGCCAAGGTGGAGCTGTACCTGTGGCTGGGCC
CAGGGCCTGGGCCTGCATGCCTTCCCACCCGTCAGCCTGGTCTACACCAAGAAGCAGGCGTTCCAGCTCCGAGCG
GTCTTCTTCATCAATCAGAGTCAGTGCACAGAGGTGCTGAATGAGACCCTGTGTCCCACCTGGGACCAGATGCTGGT
TGAAATCTATGACCAGGATTCCATGGGCAAAGCTGACTTCATGGGCCGGACCTTCGCCAAACCCCTGGTGAAGATG
AACGCCACAGCTGGAGACCTGCTGGCGGCCTTCGAGCTGCTGCAGATTGGACCAGCAGGGAAGGCTGACCTGCCC
CGTGCTCAGCAAGTACCGAGTGGAGGTGCTGTTCTGGGGCCTACGGGACCTAAAGCGGGTGAACCTGGCCCAGGT
ATAAGAAGAACCCCAACTTCAACACCCTCGTCAAGTGGTTTGAAGTGGACCTCCCAGAGAACGAGCTGCTGCACCC
CGTCAGCTCCCTGCGACGCTTCATCTACCGGCCCCCAGACCGCTCGGCCCCCAGCTGGAACACCACGGTCAGGCT
GACTATGGAGCCAGAGGTACCCATCAAGAAACTGGAGACCATGGTGAAGCTGGACGCGACTTCTGAAGCTGTTGT
CAGAGGAGGAGGAGCCAGACGAGAGCATGCTGGACTGGTGGTCCAAGTACTTTGCCTCCATTGACACCATGAAGGA
AGGGCCTGAAGGGGTCAATGAAGGGCAAGGAGAAGGCAAGGGCTGCCAAAGAGGAGAAGAAGAAGAAAACTCAGA
GTATACCCCAAAGAGCTGGAGTCCGAGTTTGATAACTTTGAGGACTGGCTGCACACTTTCAACTTGCTTCGGGGCA
TCTGCGTGTACAAAGTGCCACTCCCAGAGGACGTGTCCCGGGAAGCCGGCTACGACTCCACCTACGGCATGTTCCA
TGCACCCTGCTGACATCAACGGCAAAGCTGACCCCTACATCGCCATCCGGCTAGGCAAGACTGACATCCGCGACAAG
CCCATGGAATCCATGCTGACGGTGGCTGTGTATGACTGGGACCTGGTGGGCACTGATGACCTCATTGGGGAAACCA
TCCACACATGGCTACAATATCTGGCGGGACCCCATGAAGCCCAGCCAGATCCTGACCCGCCTCTGCAAAGACGGCA
CCCTCTGAGATTGAGGACGAGAACGGTCAGAGGAAGCCCACAGACGAGCATGTGGCGCTGTTGGCCCTGAGGCAC
TCAACCCCGACAAGCCGGGCATCGAGCAGGGCCGCCTGGAGCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGGACATGCCAGC
GGAACACAGATGAGGTGGTCTTGGAGGACGACGACTTCTTCACAGGGGAGAAGTCCAGTGACATCTTCGTGAGGGG
GAGGGCAACTTCAACTGGCGCTACCTGTTCCCCTTCGACTACCTGGCGGCGGAGGAGAAGATCGTCATCTCCAAGAA
GGGATGCGGACCACTTCTCCGCTGACGACTTCCTGGGGGCCATCGAGCTGGACCTGAACCGGTTCCCGCGGGGCGC
CATCTTCAAGCAAAAGCGCGTCAAAGGCTGGTGGCCCCTCCTGGCCCGCAATGAGAACGATGAGTTTGAGCTCACG
GGCCCGCAATGAACCTGACCCCCTAGAGAAACCCAACCGGCCCGACACGGCCTTCGTCTGGTTCCTCAACCCTCTCA
TTGGGGCTGCTCATGTTGGGGCTCTTCCTCTACAGCCTCCCTGGCTACATGGTCAAAAAGCTCCTTGGGGCATGAACT
CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT
ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAGG
CACACAGATAGACTACTGAAAGAAGGAGAAAGGGGCACTTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTACT
CCTATATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACTCTTCTACTCTTCCAGCAGACTCTTATAGAAAGAAAGATTCTGG
CTTGGAGTGAACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTGCCACAAATTCAGTCAACTACAAGAAAGT
CCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA

ITR   AK F1 рекомбинация   Акцептор сплайсинга

ФИГ.39 (продолжение)

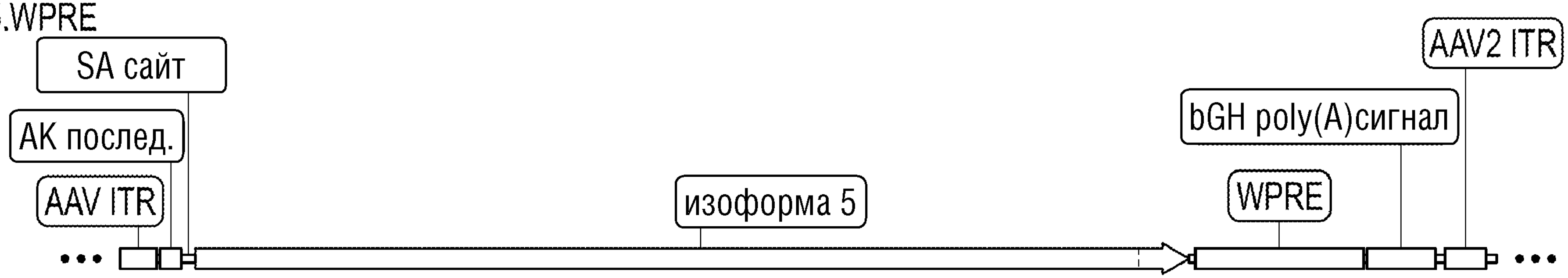


AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCA
AAATGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCCCCAGCACAGCA
CTTCTCCATCGTGGAGGAGGAGACTGGCAAGGACTGCGCCAAGGTCAAGACGCTCTTCCTTAAGCT
TCAGCAAACAGCGCAAGGAGTTCCTGTGCGGCCTGCCCTGTGGCTTCCAGGAGGTCAAGGCAGCC
CACATGTACCAGGCCCGCAGCCTCTTTGCCGCCGACAGCAGCGGACTCTCAGACCCCTTTGCCCGC
GTTCGACAACCTGGAGCTCTATGGTGAAGCTCATGAGCTGAGGGACGATCCGCCCATCATTGTCAT
GCAGACGAGGCGTACTGCCCACCCCGCTTCCCACCTCAGCTCGAGTACTACCAGATCTACCGTGGC
CCCATCAATGGCCCGGTGGACGTGGACCGAGGTCCCATCATGCCCGTGCCCATGGGCATCCGGCC
GGACCGGCCACGGGTGGACATCGAGTGTGCAGGGAAGGGGGTGCAGTCGTCCCTGATCCACAATT
GCCCTTGAACATCCGTGTGGTGGACTGCCGGGCCTTCGGTCGCTACACACTGGTGGGCTCCCATGC
TCTCCGGCGCTGCCGTGTGCTGTGCAATGGGGGCTCCTCCTCTCACTCCACAGGGGAGGTTGTGGT
CAAGGTGGATGTGGCTGAGGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGAAGAAGGGCACTGCGGAGGAGC
GCAACTTCGACAACAAGAGCCCTCTGGAATTGACTTGGAGGAGAAGGAGGAAGTGGACAATACCG
GCTCTGGCTCTGGCCAGGGGTCCGAGGCCCCCGAGAAGAAGAAACCCAAGATTGATGAGCTTAAG
AGACCGGGGATGATGAGGATGGCTCCACCGAGGAGGAGCGCATTGTGGGACGCTTCAAGGGCTCCC
GGGCATCCCGAGCAATGACCCCATCAATGTGCTGGTCCGAGTCTATGTGGTCCGGGCCACGGACC
GAGAACTACATCTCCAAGCAGCTCAACCCTGTCTTTGGGAAGTCCTTTGACATCGAGGCCTCCTTC
AGATCGACCTGGAGAACCGCTTCTACAGCAAGCACCGCGCCACCTGCGGCATCGCCCAGACCTAC
AAGTGGACGGCCCCCACTTTGGGCCCCCTGGGAGAGTGAAGGTGGCCAACCGCGTCTTCACTGGG
TGGGAGGACATCCCCCGCGCAGGCTGCCGCCTGGTGCCAGAGCATGTGGAGACGAGGCCGCTGC
CCCTGGGACGCCTCTGGACATCTCACCTCGGAAGCCCAAGAAGTACGAGCTGCGGGTCATCATCT
GTGGCTGAAGGGCCAGCAGGAGGACAAGCAGGACACAGACGTCCACTACCACTCCCTCACTGGC
GGAGTCCATGTTCTCCTGGGACGAGACCGAGTACAAGATCCCCGCGCGGCTCACCCTGCAGATCT
AAAGACAGCCAAGCAGTGCACCATGGAGATGGCCACCGGGGAGGTGGACGTGCCCCTCGTGTC
GGCAAGGTGGAGGCTGAGCTGCATTTACTGACAGCAGAGGAGGCAGAGAAGAACCCAGTGGGCCT
AGTCCATCAAGTACCTCATCTGCACCCGGTACAAGTGGCTCATCATCAAGATCGTGCTGGCGCTG
AGTGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG
AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA
ATAATTGTGGTGAACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAAACTGAAAAACTTTGACCCCGAGCACCCT
AGACTCCCTCAAGCAAATAGATCTCACTTACCACTTGCAAAGGTATACTACTTTCACTCTATTAGA
GGTCCAAGAAAGCAGTACTTTCTTACAAGGAGCCAAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCACTTGTAAC
TGAGAACACTGTTCTCCCGAAACCAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACC
CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

3'OTOF BGHpA спейсер

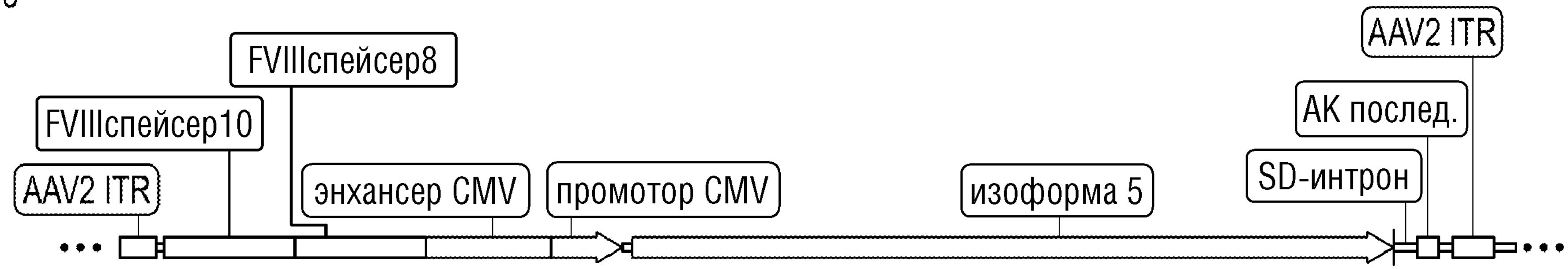
ФИГ.40

105.WPRE



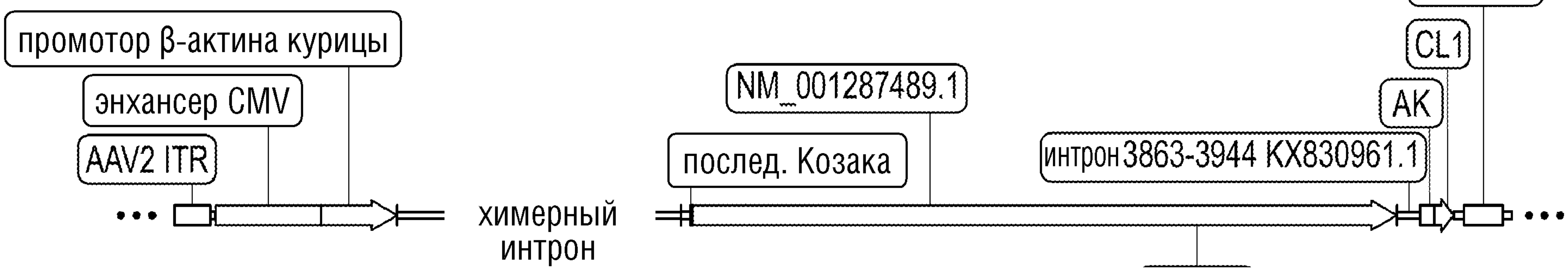
ФИГ.41

p108

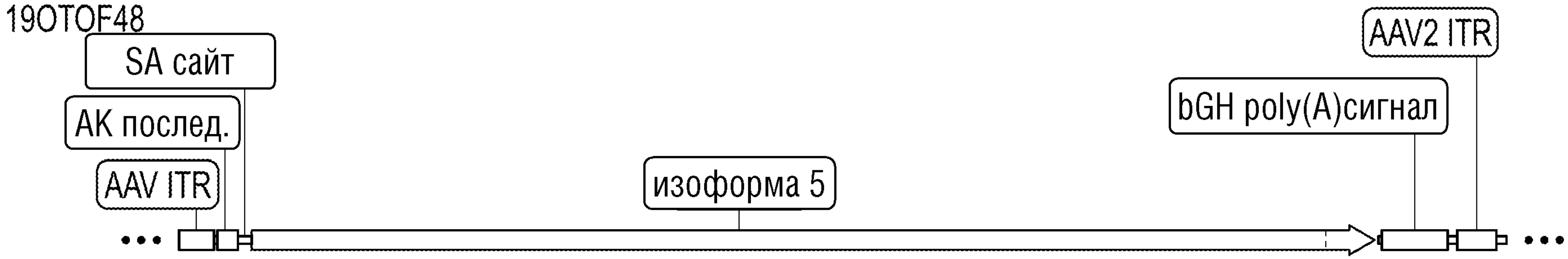


ФИГ.42

1OTOF18.CL1

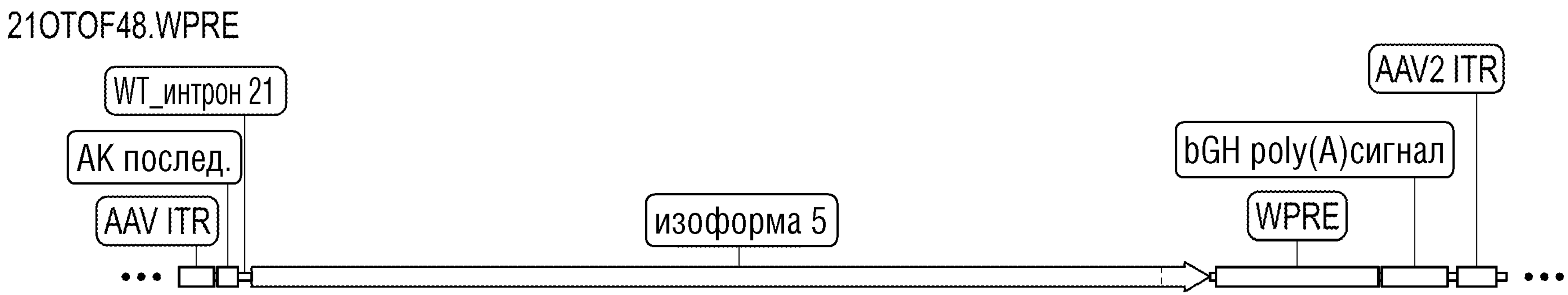


ФИГ.43

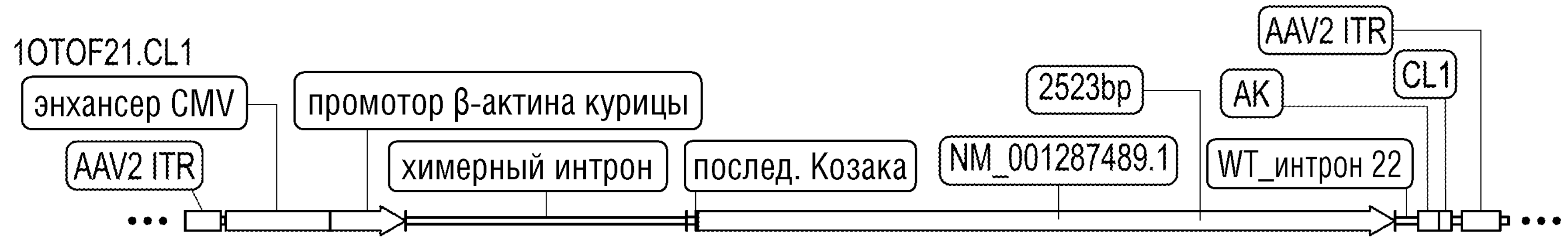


ФИГ.44

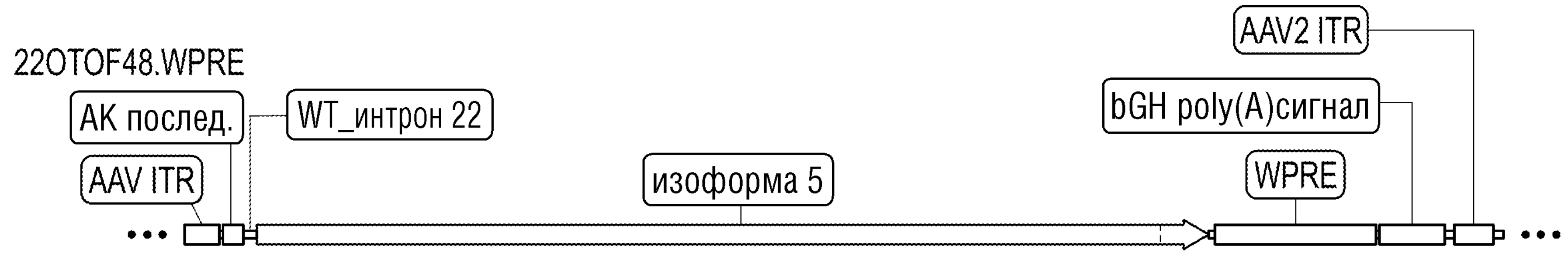
ФИГ.45



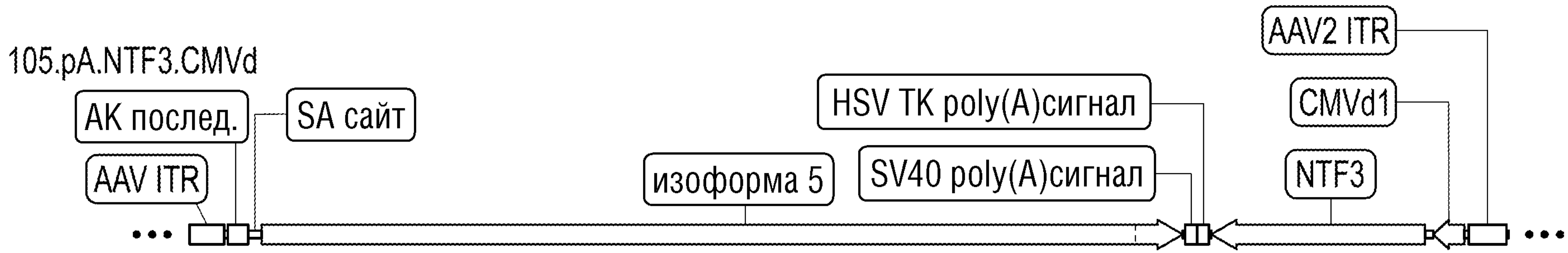
ФИГ.46



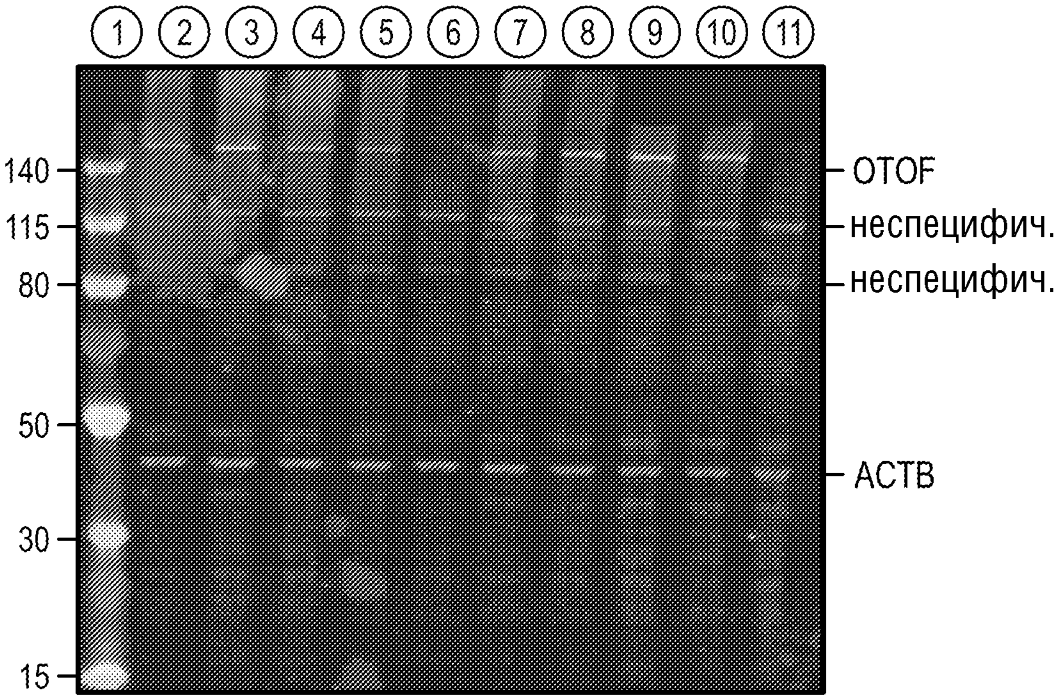
ФИГ.47



ФИГ.48



ФИГ.49

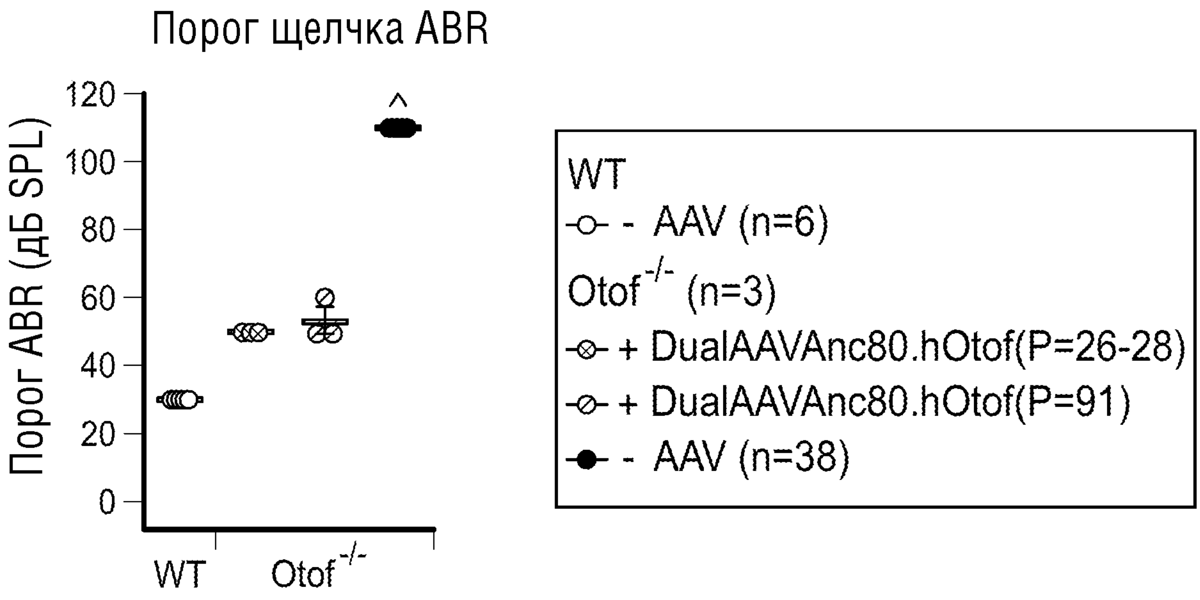


№ трека	Образец двойной плазмиды
1	Предварительно окрашенный плюс белковый маркер
2	109 + 105
3	109 + 105.WPRE
4	1OTOF18.CL1 + 19OTOF48
5	1OTOF20.CL1 + 21OTOF48.WPRE
6	1OTOF21.CL1 + 22OTOF48.WPRE
7	mus_5OTOF + mus_3OTOF
8	mus_ex6_5OTOF + mus_3OTOF
9	108 + 105
10	CMV.flOTOF.BGHpA *
11	Отрицательный контроль

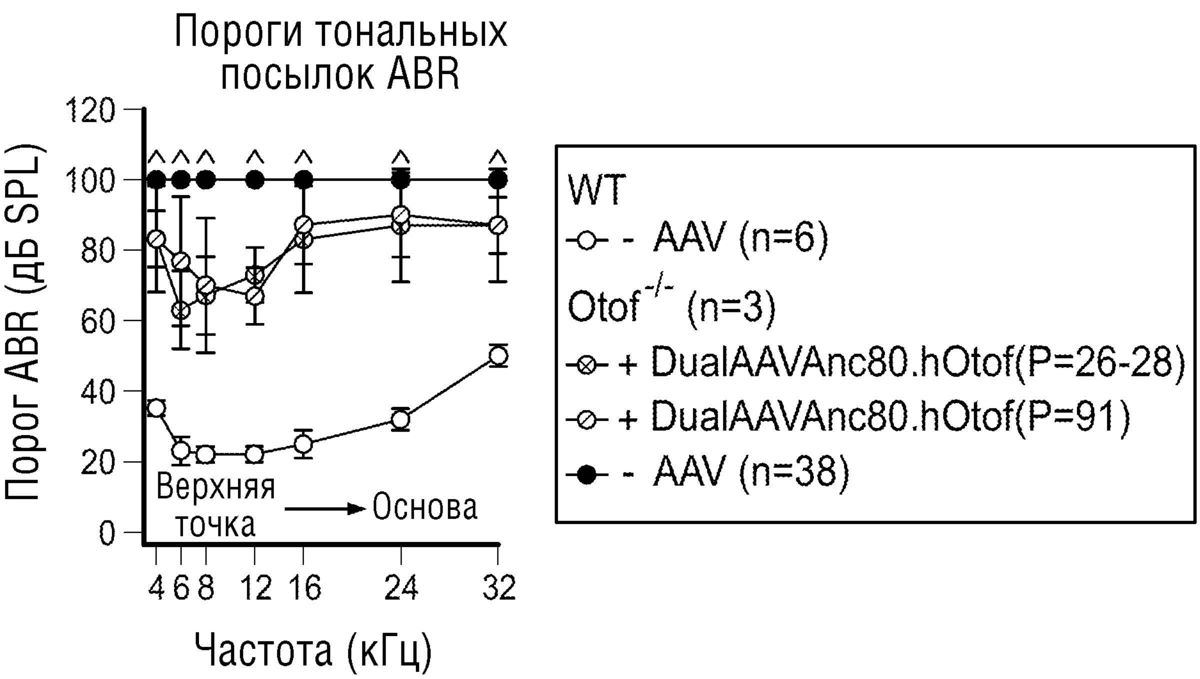
ФИГ.50

400 нг	400 нг	Эксперимент 1			Эксперимент 2			Эксперимент 3			Конец		
Плазмида 1	Плазмида 2	I.I. ACTB	I.I. OTOF	Соотн.	I.I. ACTB	I.I. OTOF	Соотн.	I.I. ACTB	I.I. OTOF	Соотн.	Среднее	STDEV	%CV
109	105	22.29	0.12	0.005	18.57	0.39	0.021	13.41	0.13	0.010	0.012	0.01	67.07
109	105WPRE	18.46	0.23	0.012	19.32	0.82	0.042	16.37	0.28	0.017	0.024	0.02	67.24
1OTOF18.CL1	19OTOF48	18.15	0.17	0.009	17.11	0.36	0.021	18.84	0.28	0.015	0.015	0.01	38.70
1OTOF20.CL1	21OTOF48.WPRE	19.47	0.30	0.015	16.52	0.22	0.013	16.97	0.15	0.009	0.013	0.00	26.80
1OTOF21.CL1	22OTOF48.WPRE	18.31	0. 04	0.002	17.07	0.03	0.002	18.32	0.00	0.000	0.001	0.00	Н/Д
mus_5OTOF	mus_3OTOF	17.37	1.00	0.058	17.97	0.36	0.020	18.77	0.32	0.017	0.032	0.02	71.58
mus_ex6_5OTOF	mus_3OTOF	16.06	0.71	0.044	16.11	0.53	0.033	16.08	0.13	0.008	0.028	0.02	65.07
108	105	15.49	1.06	0.068	15.77	0.91	0.058	18.38	0.27	0.015	0.047	0.03	60.59
CMV.fl.OTOF	CMV.fl.OTOF	18.17	0.48	0.026	16.29	0.50	0.031	14.54	0.62	0.043	0.033	0.01	25.29
Н/Д	Н/Д	19.10	0.01	0.001	16.94	-0.01	-0.001	14.73	-0.01	-0.001	0.000	0.00	N/A

ФИГ.51

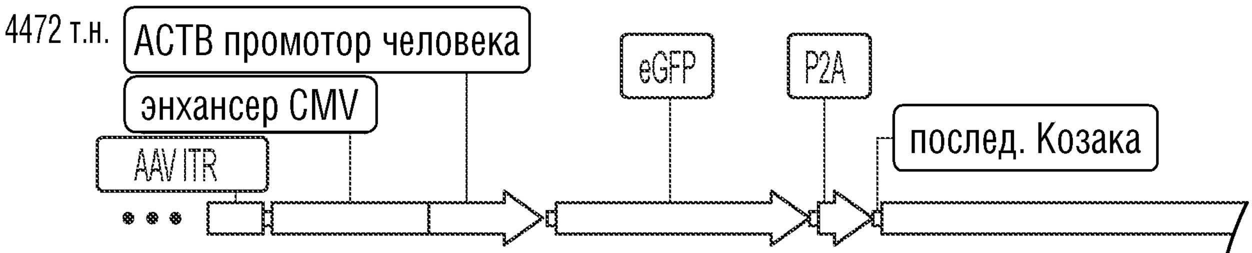

Порог щелчка ABR
Порог ABR (дБ SPL)
120
100
80
60
40
20
0
WT
Otof-/-
WT
-○- - AAV (n=6)
Otof-/- (n=3)
+ DualAAVAnc80.hOtof(P=26-28)
+ DualAAVAnc80.hOtof(P=91)
-●- - AAV (n=38)

ФИГ.52


Пороги тональных посылок ABR
Порог ABR (дБ SPL)
120
100
80
60
40
20
0
Верхняя точка
Основа
4
6
8
12
16
24
32
Частота (кГц)
WT
-○- - AAV (n=6)
Otof-/- (n=3)
+ DualAAVAnc80.hOtof(P=26-28)
+ DualAAVAnc80.hOtof(P=91)
-●- - AAV (n=38)

ФИГ.53

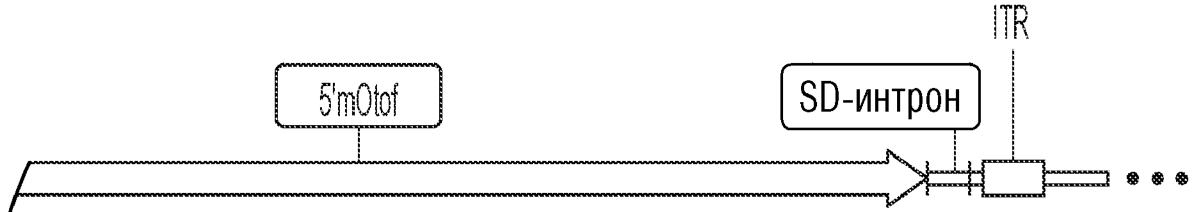
HBA.eGFP.P2A.5'mOTOF.SD



GGGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCG
TAGGGGTTCCTAGATCTAGGATCACGCGTTCTAGATCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
CTTCCTCAATCTCGCTCTCGCTCTTTTTTTTTTTCGCAAAAGGAGGGGAGAGGGGGTAAAAAAATGCTGCAC
TATGGCTCGAGCGGCCGGCCGCGGCGGCGCCCTATAAACCCAGCGGCGCGACGCGCCACCACCGCCGAGAC
CAGGTAAGCCCGGCCAGCCGACCGGGGCAGGCGGCTCACGGCCCGGCCGCAGGCGGCCGCGCCACCATGGTG
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCA
AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG
GGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCG
AGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGAATTCGCCACCATGGCCCTGATTGTTCACCTCAAGACTGTCTCAGA
TGGAGAACTGCGAGGGTGTGGCTGACTTTGATGAGACGTTCCGGTGGCCAGTGGCCAGCAGCATCGACCGGA
GCATGGTGCTGCAGAAAGTGGTGGAGGAGAATCGGGTAGAGGTGACCGACACGCTGATGGATGACAGCAATG
GGATGATGGAGACTTCCTGGGAGATGAATCCCTCCAGGAGGAGAAGGACAGCCAGGAGACAGATGGGCTGCT
GTTCTCGGCCATGAAACTCGGCAAAACTCGGTCCCACAAAGAGGAGCCCCAAAGACAAGATGAGCCAGCAGT
TCTCTAGCCTCGGTCACCGCTCTCACCAGCAATGTCTCCAACAAACGGTCTAAGCCAGATATTAAGATGGAG
CTTGAACATGGACCCTGTGGTGTGTGTGGAGGTGGGTGATGACAAGAAATACACGTCAATGAAGGAGTCCAC
ATCATCAAGATCTCGGTTATCCATTCTAAGAACCTGCTTCGGAGCGGCACCCTGGTGGGTTCCTTCAAAATG
GATGACATCTCTGCTGGGTTGAAGGGTTATGTAAAGTGTGATGTCGCTGTGGTGGGCAAGGGAGACAACATC
GCGTGCCCCCCGAACGGCAGTGGGCACGGTTCTATGTGAAAATTTACCGAGCAGAGGGACTGCCCCGGATGA
TGTGCAAGTCTTCTTTGCTGGACAAAAGGGCAAAACATCAGTGCAGAAGAGCAGCTATGAGCCGCTATGGAA
TGACAAGGTCAATGATGTGGCCATCGGCACCCACTTCATCGACCTGCGCAAGATTTCCAACGATGGAGACAA
TGGACGAGCACCAGGACTTGAATGAAGGCCTGGGGGAGGGTGTGTCCTTCCGGGCCCGCCTCATGTTGGGAC
AGGCCACGCCTGTCTCGGAGAGCTGCACAGGGAGAATGGAAGAATTTTTTCTATTTGGAGCCTTCTTGGAAG
ATGAAGTCGATGGTATGTCCCGGCCCCTGAGGCCTCGGCCCCGGAAAGAGCCTGGGGATGAAGAAGAGGTAG
CCCCACCTATGGGGCCCCAGATCACGGACAGGAACTATTTCCACCTGCCCTACCTGGAGCGCAAGCCCTGCA
GCTGACAAGCTGGAAGAAGGCCTGAATGATGTACAGGAGATGATCAAAACGGAGAAGTCCTACCCGGAGCGC
ACCAGGGCCGCTCGTCCCGCACCAGGCTGGATCGAGAGCGTCTTAAGTCCTGTATGAGGGAGTTGGAGAGCA
CATGCCAGAACTTTCTGCAGAAGCTACGCTTCCTGGCGGATCACCTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
GATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCG
AGGGAGTGGCCAA

ITR CMV/HBA GFP 5'mOTOF Донор сплайсинга

ФИГ.53 (продолжение)



GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
TGGTGATGCGGTTTTGGCGGCCGGGCCCAGCACCCCAAGGCGGCCAACGCCAAAACTCTCCCCCCTCCT
TGTGCGGCGAAGCCGGTGAGTGAGCGGCGCGGGGCCAATCAGCGTGCGCCGTTCCGAAAGTTGCCTTT
CGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGC
AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
TCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC
TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
CAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC
ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA
GCATGGACGAGCTGTACAAGAAGCTTGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGG
GCTCCGAGGCAAAGGTGACCGGATTGCCAAAGTCACTTTCCGAGGGCAGTCTTTCTACTCCCGGGTCC
ATGAAGTGTTGGAGATTCAGATTTTCAACTACAGCAAAGTCTTCAGCAACAAGCTGATAGGGACCTTCT
CTATCATCAAGACCAGCCTGAGCATGGAGGTCCGGTATCAGGCCACAGATGGCACTGTGGGCCCCTG
ACCTGGTTCCCGACCCAGCACCCGGATATCTGGCGAGAAGAGCTTTCGCAGAGCGGGAAGGAGTGT
GCTGGAGATGGAGGACCTGGACCACCTAGCCATTCAGCTGGGGGATGGGCTGGACCCTGACTCCGTG
CCCAGTGCTGGAAGGCCCATGGATTACCAGGTCAGCATCACAGTGATTGAGGCTCGGCAGCTGGTGGG
AAACTGCCCTTACTACAACGAGTACTTTGTCTTCGACTTCCATGTCTCTCCTGATGTCATGTTTGACAAG
GATGTGGGGACTGTGTATTCCCAGCCTGAACACCAGTTCCATCACAAATGGGCCATCCTGTCAGACCCC
AAGACACCCCACAACGCCAACGAGACGGATGAGGACGACATTGAAGGGAACTTGCTGCTCCCCGAGG
ACACAAGCCTCATGGCCAACGTGAAGAAGGCGTTCATCGGTGAGAACAAGGACCTCGTCGACCCCTA
TGAGCAGGTCGTCTTCACAGACTTGTTCCCCCCACTCTGCAAACGCATGAAGGTGCAGATCCGGGACTC
AGGCTTCCTGCCTACCCTCGGTCCAGCCTGGGTGAACATGTACGGCTCCACGCGCAACTACACACTGC
TAGCTGTGGAGATCCTGGACACCTCCAACCCAGAGCTCACCAGCTCCACGGAGGTGCAGGTGGAGC
CCTCAATGATTGACCGGAAAAATGGGGACAAGCCAATTACCTTTGAGGTGACCATAGGAAACTACGGCA
ACCTGATTCAGAACTCCAGTGACGATGAAGGTGACGAAGCCGGGGACCTGGCCTCGGTGTCCTCCA
TCTATATCAAGAGCTGGTGGCCTGACCAGAGGCGGCGCCTCTACAATGCCAACATCATGGATCACATT
CGCCTGCGGGGTGTGCTAGAGGAACTCAGCTGTGGCTGCCACCGCTTCCTCTCCCTCTCGGACAAGG
TGGGACAGCAGGCCAAGAGCCTGAGGGCTCAGGTGAAGCGGCACACTGTTCGGGACAAGCTGAGGT
AAGGAGAGCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGGCATGCTGGGGAGA
GGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG

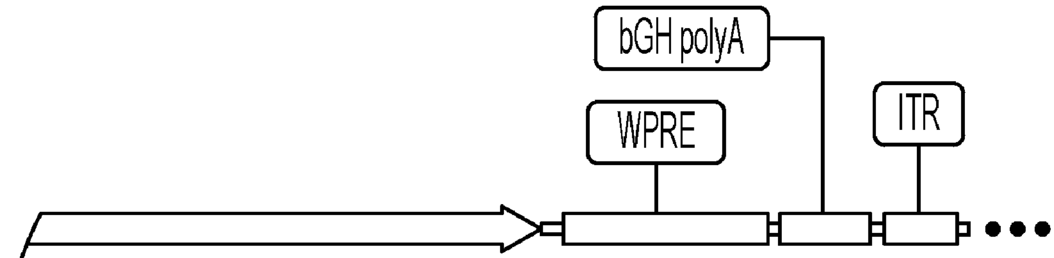
ФИГ.54

SA.3'mOTOF.WPRE
4674 т.н.

GGGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGC
ACTAGGGGTTCCTAGATCTAGGATCACGCGTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTC
CCTATGCCCGCGTGCCTTCCAAAGACCTGCTCTTCTCCATCGTGGAGGAGGAACTGGGCAAGGACTGCGCCAAAG
CAGGCCAAGCTGGAGCTCTACCTGTGGCTGGGCCTCAGCAAGCAGCGAAAGGACTTCCTGTGTGGTCTGCCCTGT
AGTCTACACCAAGAAGCAAGCCTTCCAGCTCCGAGCACACATGTATCAGGCCCGAAGCCTCTTTGCTGCTGACAG
CTAAACGAGACACTGTGTCCCACCTGGGACCAGATGCTGGTATTTGACAACCTGGAGCTGTACGGTGAAGCTCAC
CCGACTTCATGGGCCGGACCTTCGCCAAGCCCCTGGTGAAGATGGCAGATGAAGCATACTGCCCACCTCGCTTCC
GCCTTCGAGCTGCTGCAGATTGGGCCATCAGGGAAGGCTGACCTGCCACCCATCAATGGCCCAGTGGACATGGAC
AGGTGCTGTTCTGGGGCCTGAGGGACCTAAAGAGGGTGAACCTGGCCCAGGTGGACCGACCACGGGTGGACATCG
AACACGCTGGTCAAGTGGTTTGAAGTGGACCTCCCGGAGAATGAGCTCCTGCACCCACCCTTGAACATCCGAGTG
GCGCTTCATCTACCGACCTCCAGACCGCTCAGCCCCCAACTGGAACACCACAGGGGAGGTTGTAGTAAGCATGGA
TGGTCAAGGTGGATGTGGCTGAAGATGAGAAGGAAAGGAAGAAGAAGAAAAAGAAAGGCCCGTCAGAGGAGCCAG
ACAATGAAGGAGCAACTTCGACAACATGAGACCTCTGGAACTGACTTGGAAGAGAAGGAAGAGATGGAAAGCGCT
GAAGAAAAACCAGAGCCCTGGCCCTGGCCAGGGATCGGAGGCTCCTGAGAAGAAGAAAGCCAAGATCGATGAGCT
TCAACCTGTTGAGGGGCAAGACGGGAGATGATGAGGATGGCTCCACAGAGGAGGAGCGCATAGTAGGCCGATTCA
GATCCCACCTATGGAATGTTCCAGGGCATCCCAAGCAATGACCCCATCAATGTGCTGGTCCGAATCTATGTGGTC
TTAGGCAAGACCGACATCCGAGACAAGGAGAACTACATCTCCAAGCAGCTCAACCCTGTGTTTGGGAAGTCCTTT
GTGGGCACTGATGACCTCATCGGAGAAACCAAGATTGACCTGGAAAACCGCTTCTACAGCAAGCATCGCGCCACC
AGCCAGATCCTGACACGCCTCTGTAAAGAGGGCAAAGTGGACGGCCCCCACTTTGGTCCCCATGGGAGAGTGAGG
CACAGATGAGCACGTGGCACTGTCTGCTCTGAGACACTGGGAGGACATCCCCCGGGTGGGCTGCCGCCTTGTGCC
CTGGAGCTGTGGGTGGACATGTTCCCCATGGACATGCCAGCCCCTGGGACACCTCTGGATATATCCCCCAGGAAA
TGATTTCTTCACGGGAGAGAAGTCCAGTGACATTTTTGTGAGGGGGTGGCTGAAGGGCCAGCAGGAGGACAAACA
CCCCTTCGACTACCTAGCGGCCGAAGAGAAGATCGTTATGTCCAAAAAGGAGTCTATGTTCTCCTGGGATGAGAC
CGACTTCCTGGGGGCTATCGAGCTGGACCTGAACCGGTTCCCGAGGGGCGCTAAGACAGCCAAGCAGTGCACCAT
AAGGCTGGTGGCCCCTCCTGGCCCGCAATGAGAATGATGAGTTTGAGCTCACAGGCAAAGTGGAGGCGGAGCTAC
TCCCCTAGAAAAACCCAACCGGCCTGACACGGCATTCGTCTGGTTCCTGAACCCACTCAAATCTATCAAGTACCT
CTGGCCCTCTTCCTTTACAGCCTCCCAGGCTACATGGTCAAGAAGCTCCTAGGGGCCTGAGGTACCGCGGCCCG
TGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTA
TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTG
GGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTC
TCCCCGCCTGATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG
GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC

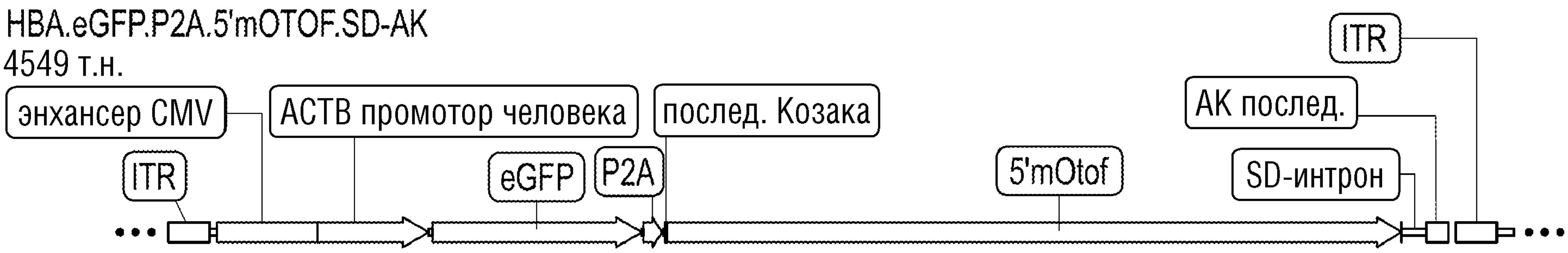
ITR | Акцептор сплайсинга | 3'OTOF | WPRE | BGhpA

ФИГ.54 (продолжение)

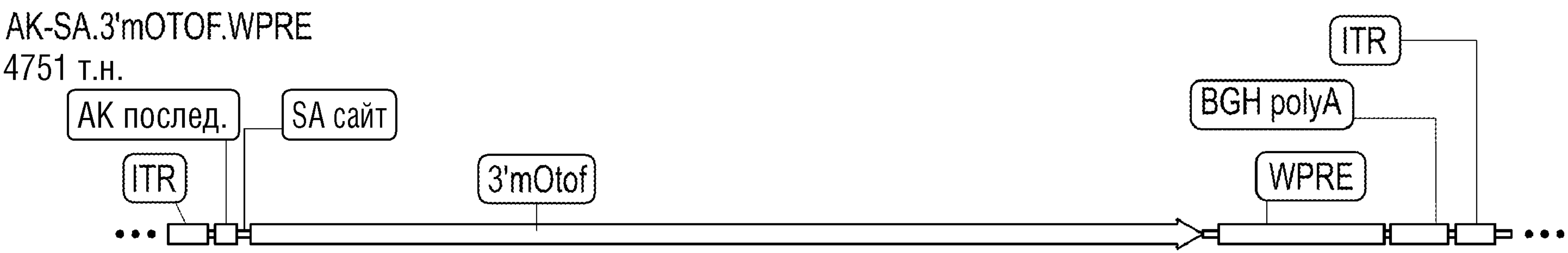


TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
TCCACAGCCCCAGCACAGCATTCCGGATGTGTTCATTTGGATGATGAGCAACAACAAACGTATCG
TCAAGACCCTCTTCCTGAAGCTGCCAGGGAAGAGGGGCTTCGGCTCGGCAGGCTGGACAGTA
GGCTTCGAGGAGGTCAAGGCAGCCCAAGGCCTGGGCCTGCATTCCTTTCCGCCCATCAGCCT
CAGTGGGCTCTCTGATCCCTTTGCCCGTGTCTTCTTCATCAACCAGAGCCAATGCACTGAGGTT
GAGTTACGAGATGATCCCCCCATCATTGTCATTGAAATCTACGACCAGGACAGCATGGGCAAAG
CGCCGCAGCTTGAGTACTACCAGATCTACCGAGGCAGTGCCACTGCCGGAGACCTACTGGCT
AGAGGGCCCATCATGCCTGTGCCCGTGGGAATCCGGCCAGTGCTCAGCAAGTACCGAGTGG
AGTGTGCAGGAAAGGGGGTACAATCCTCCCTGATTCACAATTATAAGAAGAACCCCAACTTC
GTAGATTGCCGGGCCTTTGGACGATACACCCTGGTGGGTTCCCACGCAGTCAGCTCACTGA
GCCTGAGGAGCCAGTTAAGAAGCTGGAGACCATGGTGAAACTGGATGCGACTTCTGATGCTG
AGGAGGAAGAGCCCGATGAGAGCATGCTGGATTGGTGGTCCAAGTACTTCGCCTCCATCGAC
GAGGGCCTGAAGGGACCAATGAAGAGCAAGGAGAAGTCCAGAGCTGCAAAGGAGGAGAAAAA
TAAGGTGTACCCCAAGGAGCTGGAATCGGAGTTTGACAGCTTTGAGGACTGGCTGCACACCT
AGGGCTCCCTCTGTGTGTACAAAGTGCCACTCCCAGAAGATGTATCTCGAGAAGCTGGCTAT
CGGGCCACAGACCTGCACCCGGCCGACATCAATGGCAAAGCTGACCCCTATATTGCCATCAAG
GACATTGAGGCCTCCTTCCCCATGGAGTCCATGTTGACAGTGGCCGTGTACGACTGGGATCTG
TGCGGCATCGCACAGACCTATTCCATACATGGCTACAATATCTGGAGGGACCCCATGAAGCCC
GTTGCCAACCGTGTCTTCACGGGGCCTTCAGAAATAGAGGATGAGAATGGTCAGAGGAAGCC
GGAACACGTGGAGACCAGGCCGCTGCTCAACCCTGACAAGCCAGGCATTGAGCAGGGCCGC
CCCAAGAAGTACGAGCTGCGGGTCATCGTGTGGAACACAGACGAGGTGGTCCTGGAAGACGA
GGACACAGATGTCCACTATCACTCCCTCACGGGGGAGGGCAACTTCAACTGGAGATACCTCTT
GGAGTACAAGATCCCTGCGCGGCTCACCCTGCAGATCTGGGACGCTGACCACTTCTCGGCTGA
GGAGATGGCCACCGGGGAGGTGGACGTACCCCTGGTTTCCATCTTTAAACAGAAACGTGTCA
ACCTACTCACGGCAGAGGAGGCAGAGAAGAACCCTGTGGGCCTGGCTCGCAATGAACCTGA
CATCTGCACCCGGTACAAGTGGCTGATCATCAAGATCGTGCTGGCGCTGCTGGGGCTGCTCATG
GGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT
TCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA
GGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCAC
GTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC
TGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCC
TTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTA
CAAGGGGGAGGATTGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAGAGATCTAGGAACCCCTAGT
GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

ФИГ.55

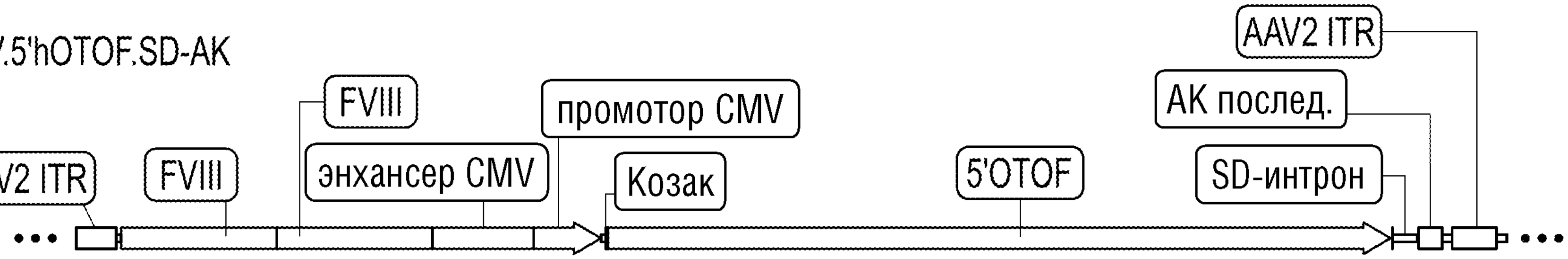

HBA.eGFP.P2A.5'mOTOF.SD-AK
4549 т.н.
энхансер CMV
ACTB промотор человека
послед. Козака
ITR
AK послед.
ITR
eGFP
P2A
5'mOtof
SD-интрон

ФИГ.56


AK-SA.3'mOTOF.WPRE
4751 т.н.
AK послед.
SA сайт
ITR
3'mOtof
ITR
BGH polyA
WPRE

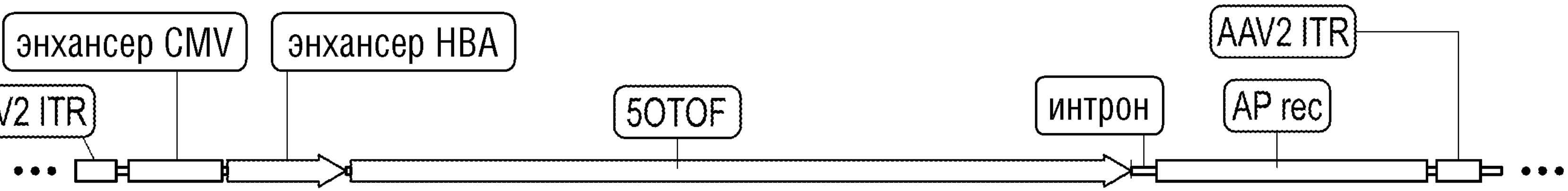
ФИГ.57

(108) CMV.5'hOTOF.SD-AK
4567 т.н.



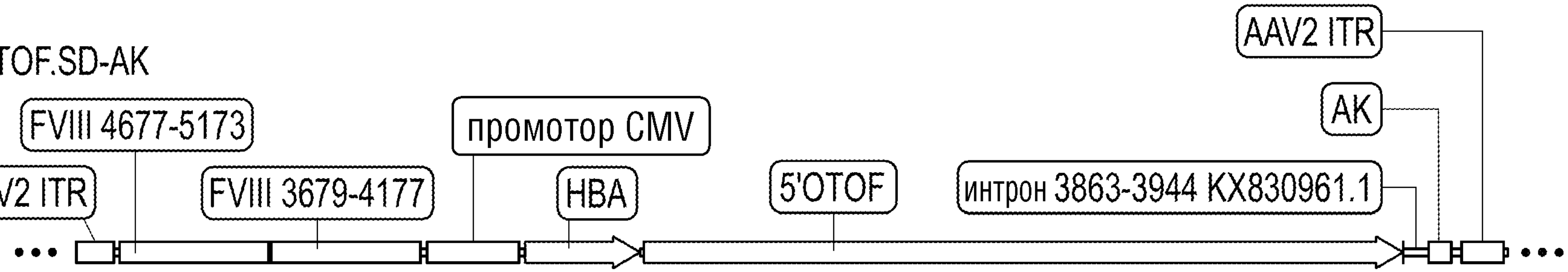
ФИГ.58

HBA.5'hOTOF.SD-AP
4540 т.н.



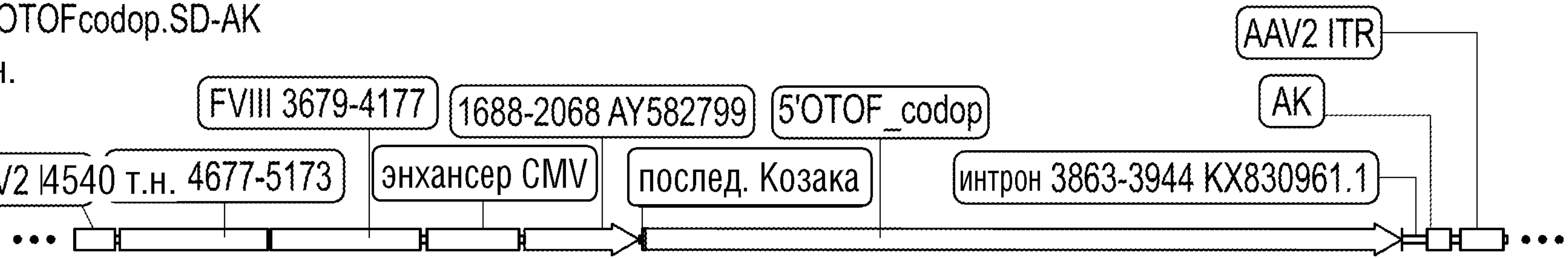
ФИГ.59

HBA.5'hOTOF.SD-AK
4745 т.н.



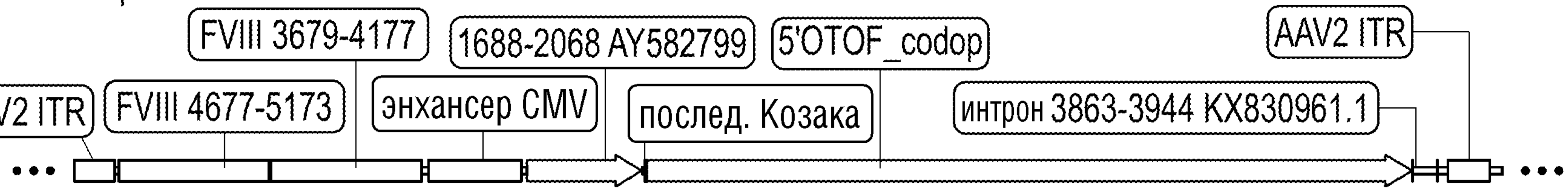
ФИГ.60

HBA.5'hOTOFcodop.SD-AK
4745 т.н.



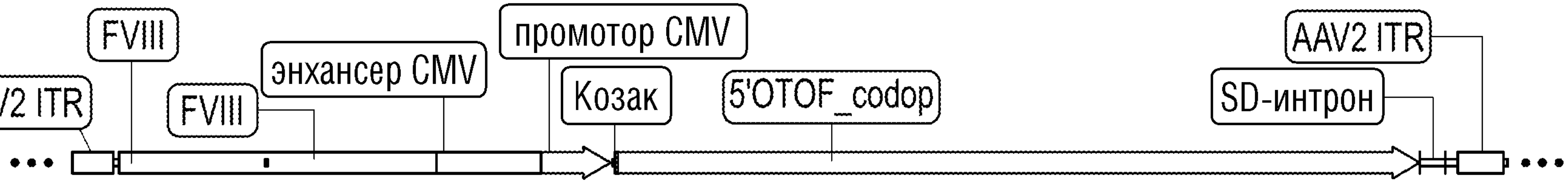
ФИГ.61

HBA.5'hOTOFcodop.SD
4668 т.н.

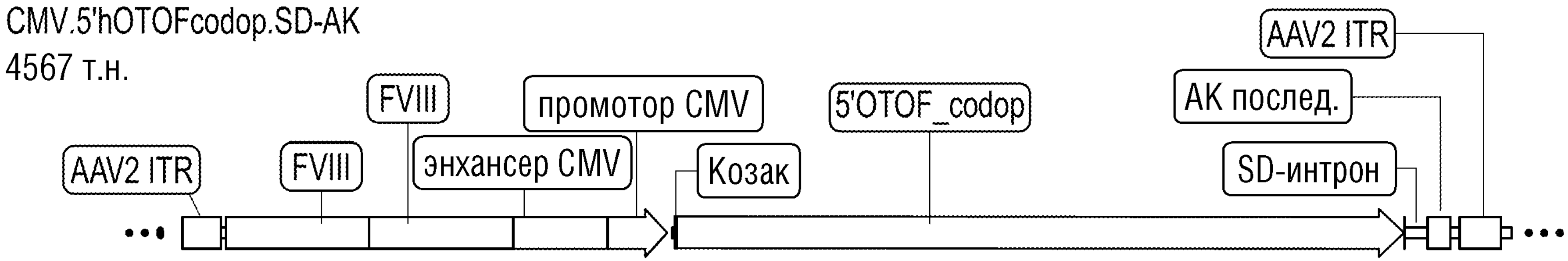


ФИГ.62

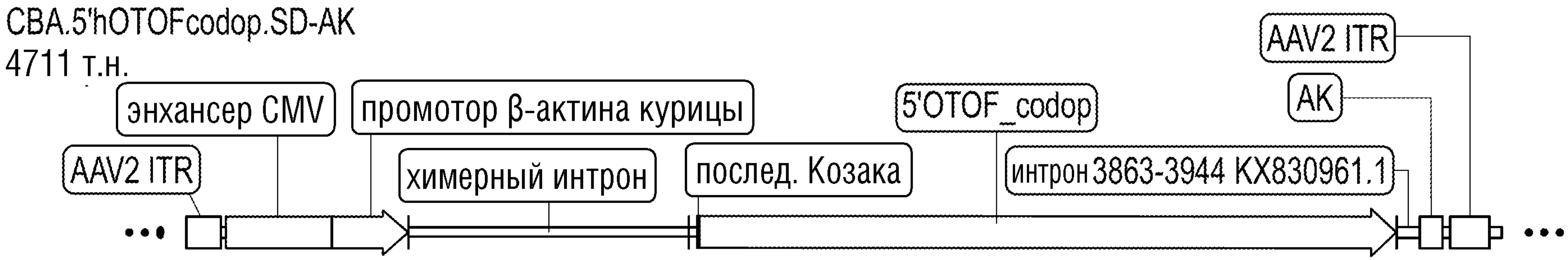
CMV.5'hOTOFcodop.SD
4490 т.н.



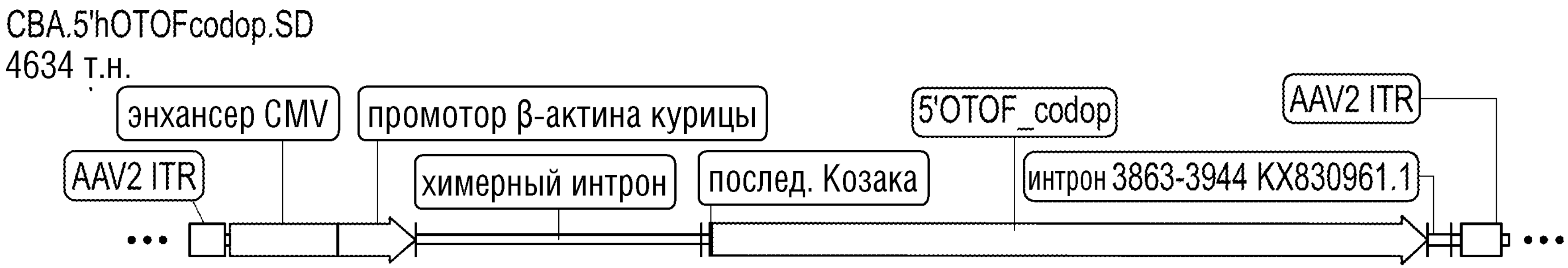
ФИГ.63



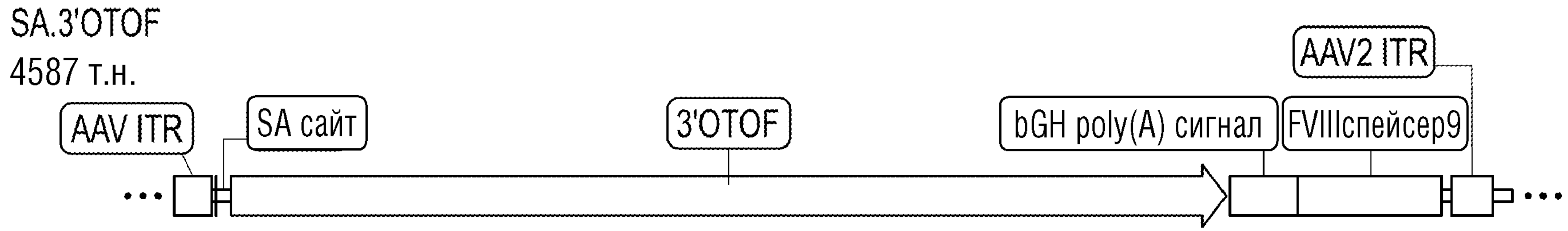
ФИГ.64



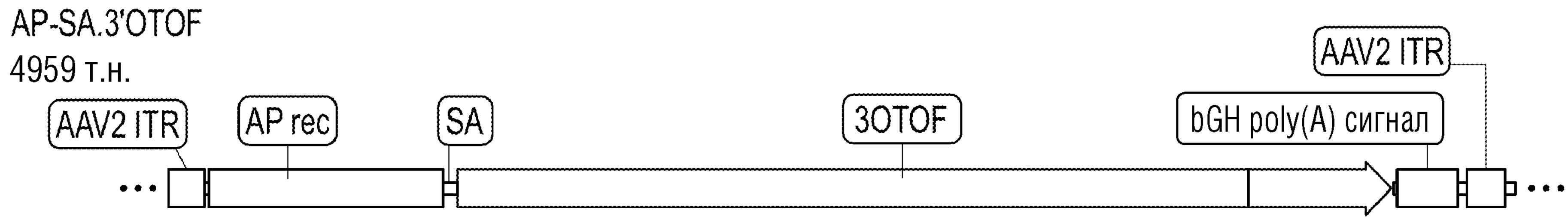
ФИГ.65



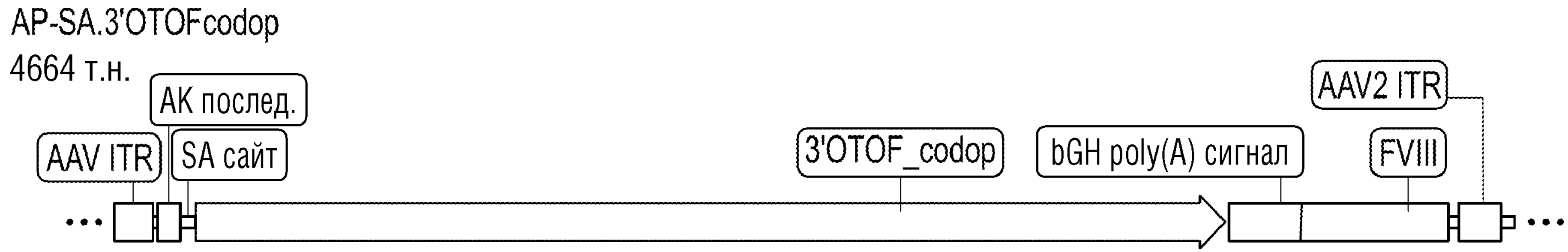
ФИГ.66



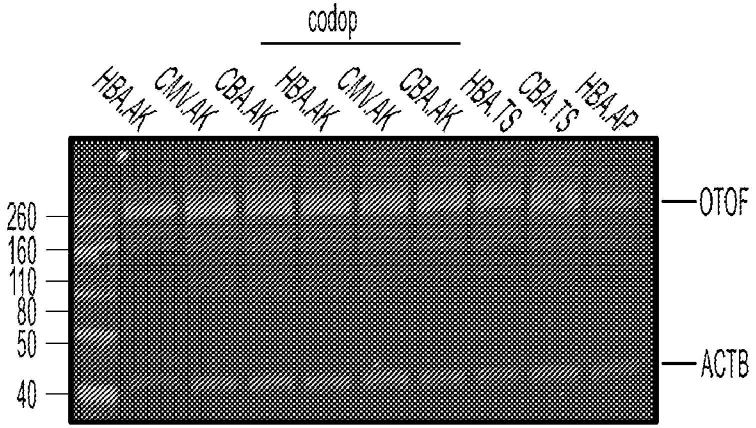
ФИГ.67



ФИГ.68

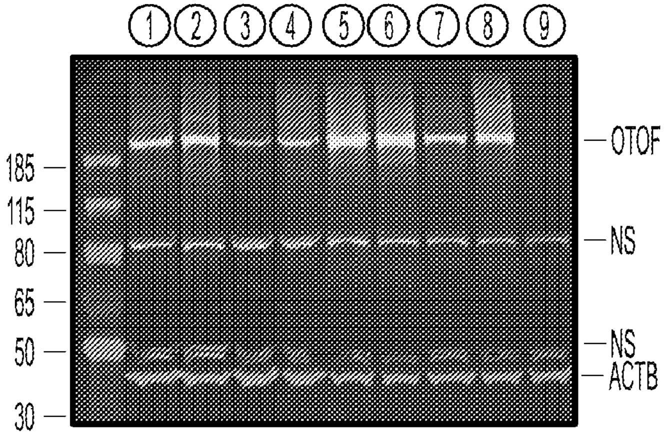


ФИГ.69



	HBA.AK	CMV.AK	CBA.AK	HBA.AK	CMV.AK	CBA.AK	HBA.TS	CBA.TS	HBA.AP
эксперимент 1	3.35	3.42	3.57	4.88	3.44	2.68	2.41	2.88	3.54
эксперимент 2	9.25	5.32	3.80	4.24	3.25	4.82	4.73	3.69	3.55
эксперимент 3	7.11	5.83	3.82	4.13	3.44	5.97	5.72	7.88	4.81
среднее	6.57	4.85	3.73	4.41	3.38	4.49	4.29	4.82	3.96
STDEV	2.99	1.27	0.14	0.40	0.11	1.67	1.70	2.68	0.73

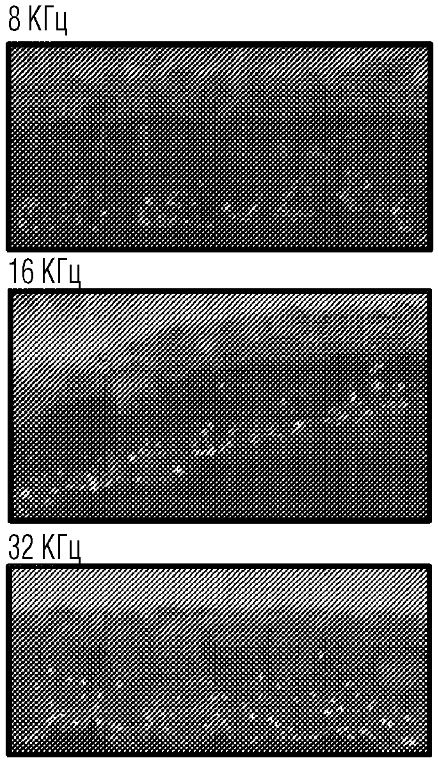
ФИГ.70



1. CBA.OTOF(AK) - MOI 503K
2. CBA.OTOF(AK) - MOI 1,510K
3. CBA.OTOF(AK) - MOI 100K
4. CBA.OTOF(AK) - MOI 303K
5. CMV.OTOF(AK) - MOI 638K
6. CMV.OTOF(AK) - MOI 1,910K
7. CMV.OTOF(AK) - MOI 127K
8. CMV.OTOF(AK) - MOI 382K
9. Отрицательный

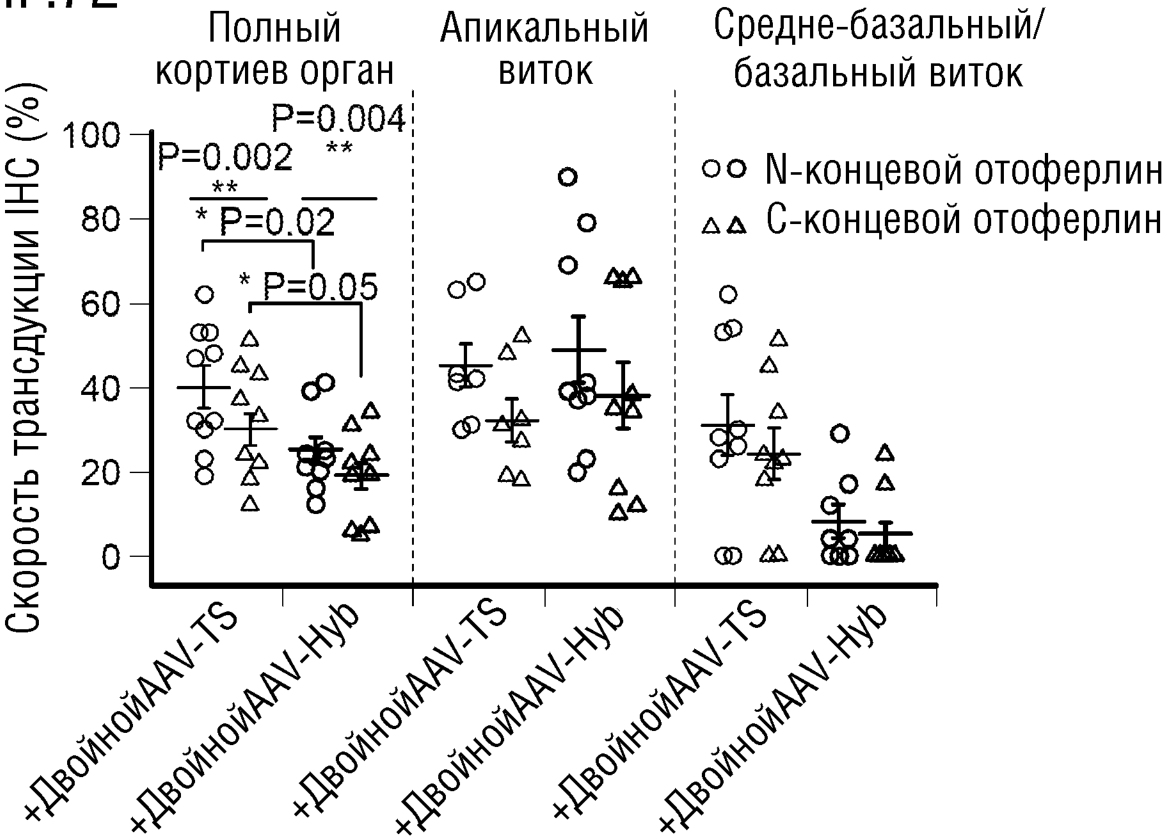
5'OTOF = 95D
3'OTOF = 131KD

ФИГ.71

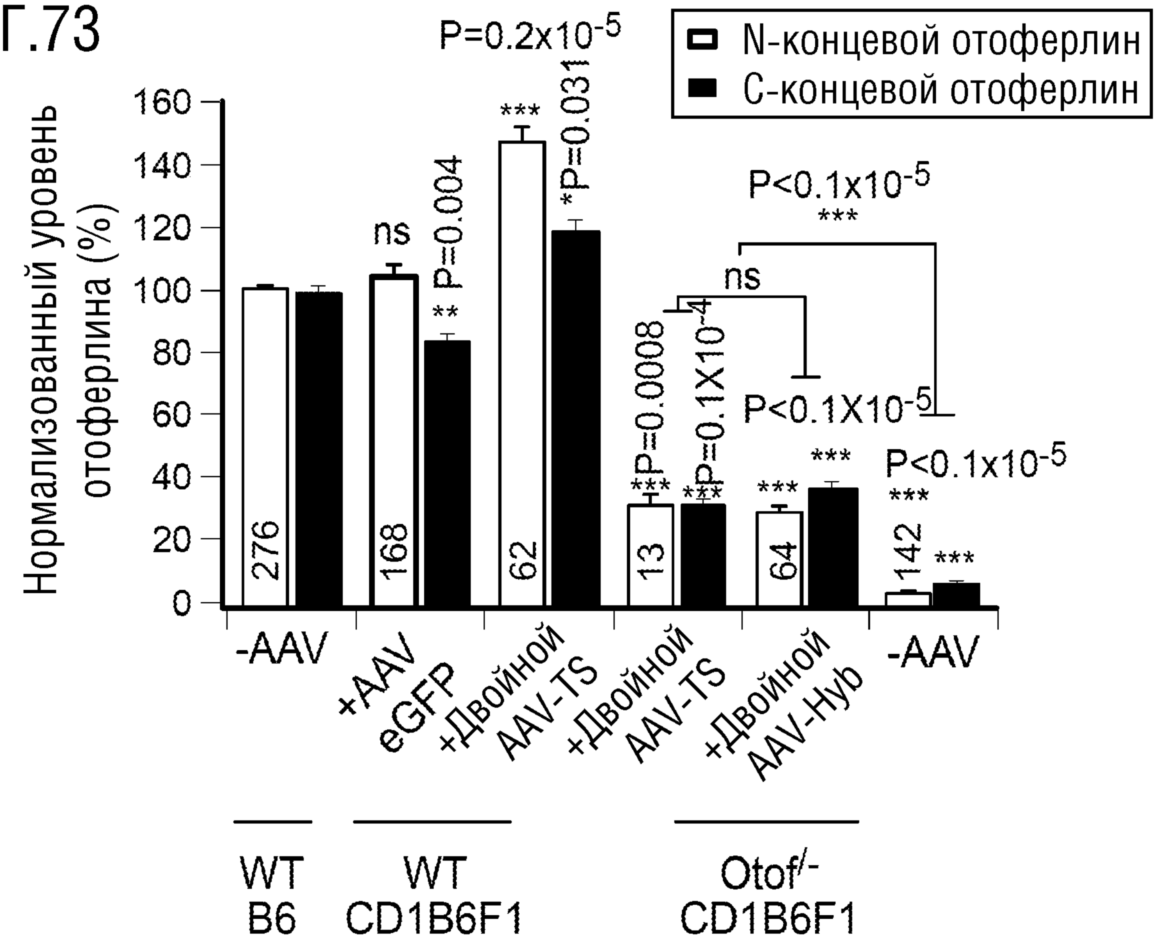


OTOF/CtBP2/ GluA2

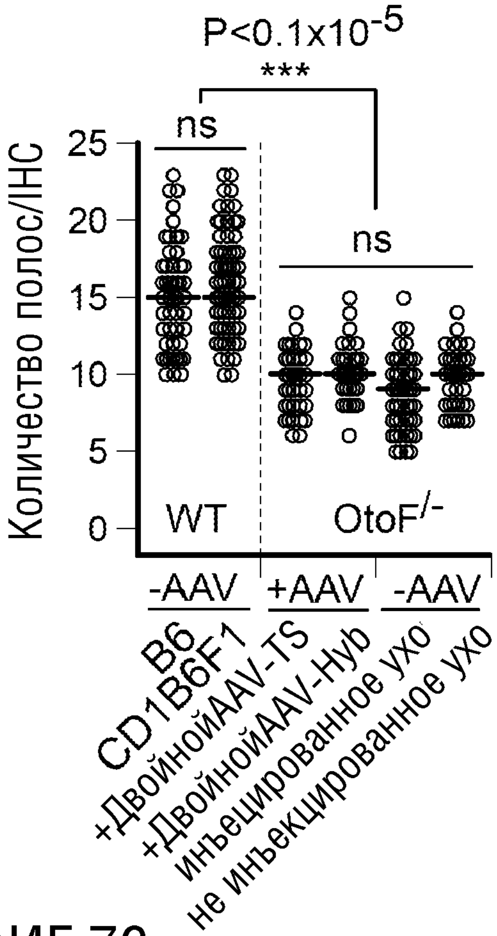
ФИГ.72


Полный кортиев орган
Апикальный виток
Средне-базальный/ базальный виток
Скорость трансдукции IHC (%)
100
80
60
40
20
0
P=0.004
P=0.002
**
**
* P=0.02
* P=0.05
N-концевой отоферлин
C-концевой отоферлин
+ДвойнойAAV-TS
+ДвойнойAAV-Hyb
+ДвойнойAAV-TS
+ДвойнойAAV-Hyb
+ДвойнойAAV-TS
+ДвойнойAAV-Hyb

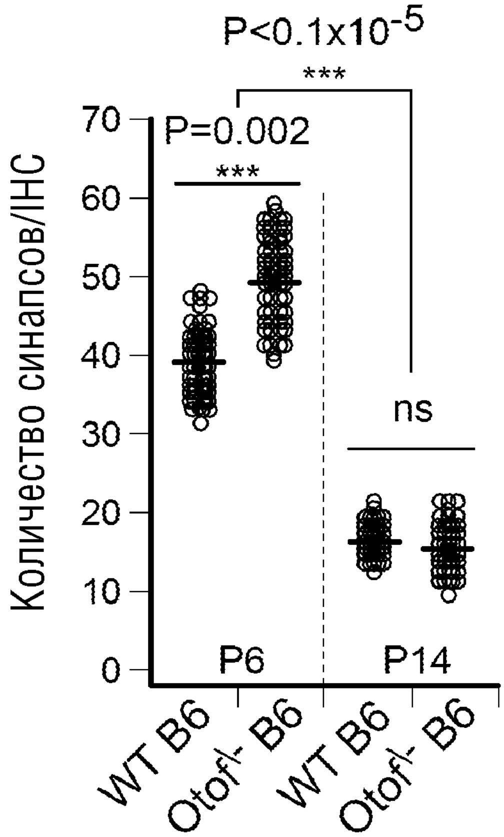
ФИГ.73


P=0.2x10^{-5}
N-концевой отоферлин
C-концевой отоферлин
Нормализованный уровень отоферлина (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ns
** P=0.004
***
*P=0.031
P<0.1x10^{-5}
***
ns
***P=0.0008
***P=0.1X10^{-4}
P<0.1X10^{-5}
***
***
P<0.1x10^{-5}
***
***
276
168
62
13
64
142
-AAV
+AAV eGFP
+Двойной AAV-TS
+Двойной AAV-TS
+Двойной AAV-Hyb
-AAV
WT B6
WT CD1B6F1
Otof$^{/-}$ CD1B6F1

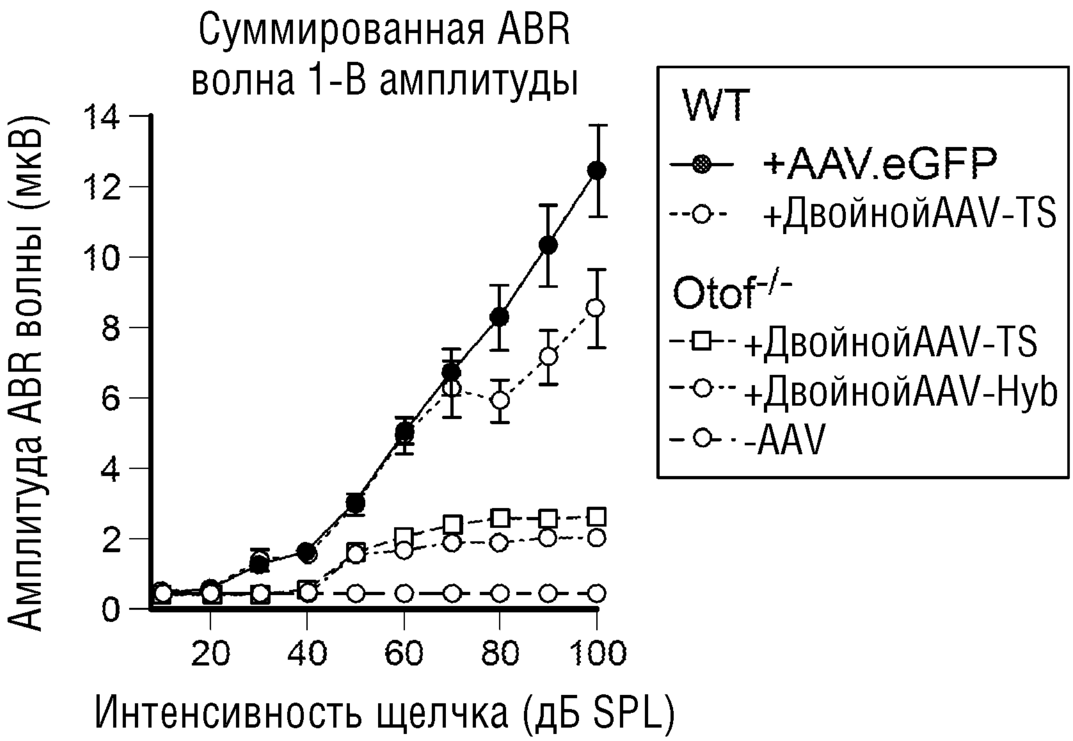
ФИГ.74



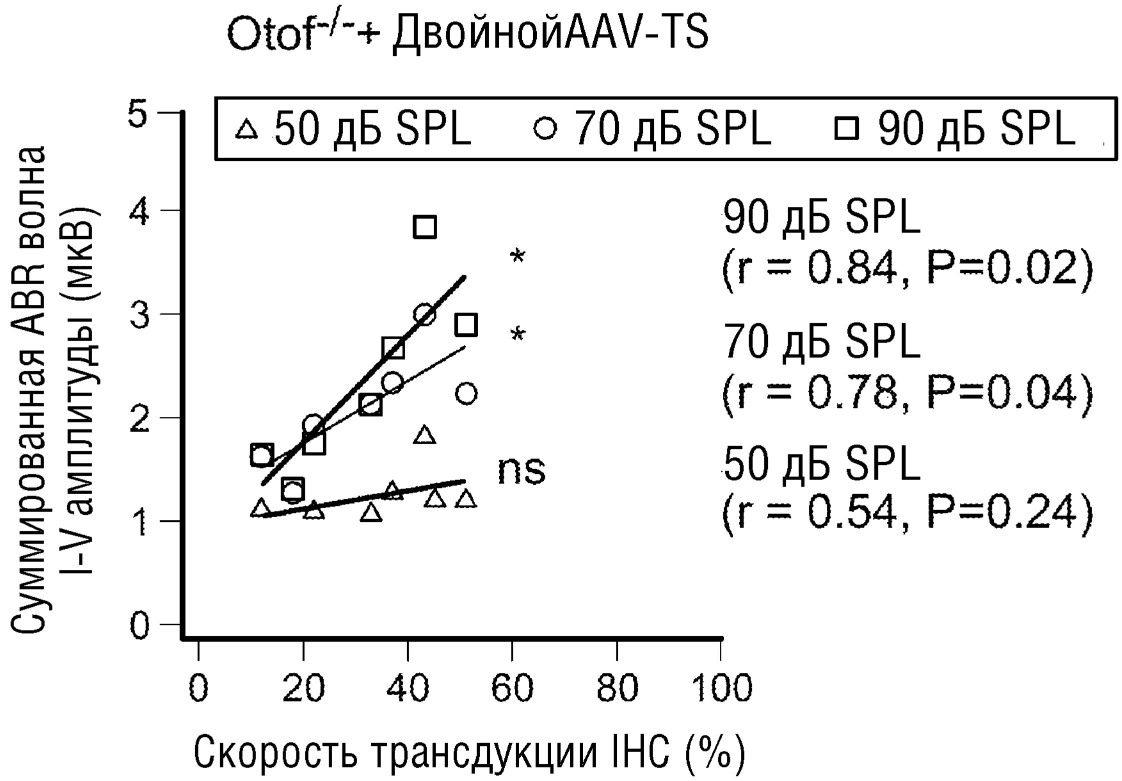
ФИГ.75



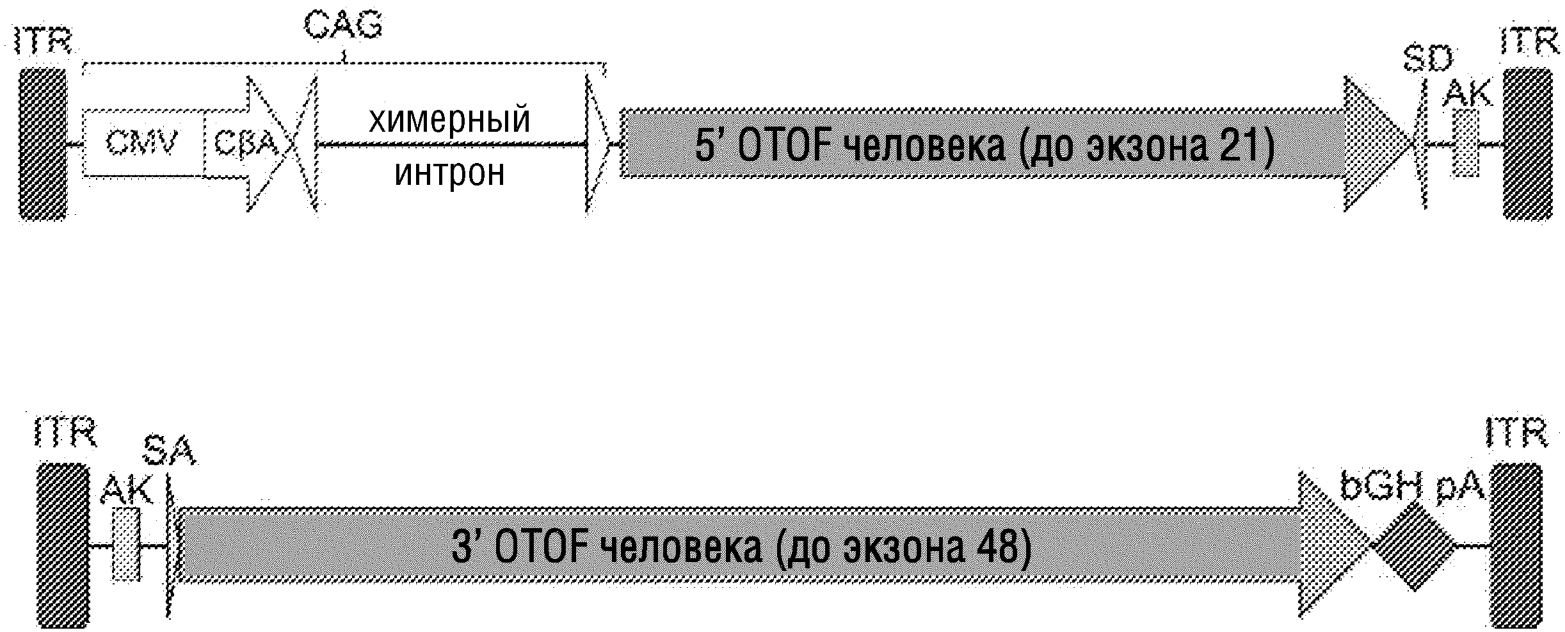
ФИГ.76



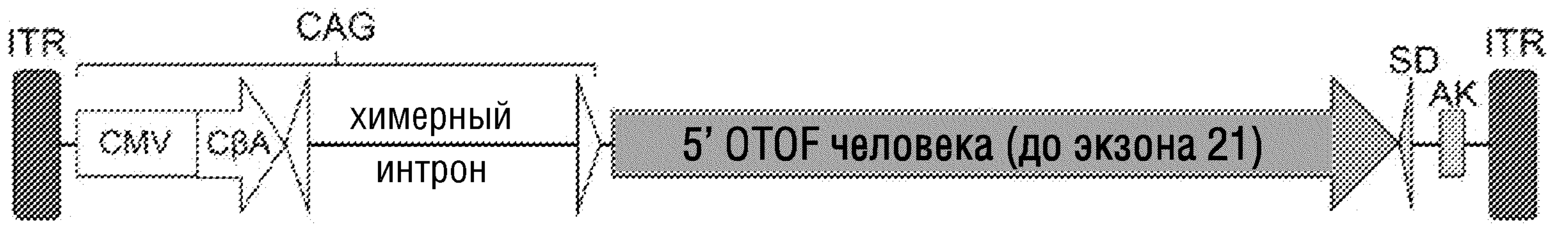
ФИГ.77


Otof-/-+ ДвойнойAAV-TS
50 дБ SPL
70 дБ SPL
90 дБ SPL
Суммированная ABR волна I-V амплитуды (мкВ)
5
4
3
2
1
0
*
*
ns
90 дБ SPL
(r = 0.84, P=0.02)
70 дБ SPL
(r = 0.78, P=0.04)
50 дБ SPL
(r = 0.54, P=0.24)
0
20
40
60
80
100
Скорость трансдукции IHC (%)

ФИГ.78

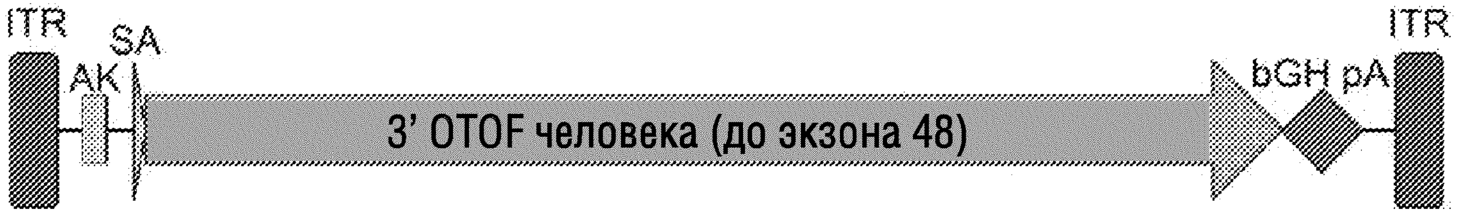

ITR
CAG
CMV
CβA
химерный
интрон
5' OTOF человека (до экзона 21)
SD
AK
ITR
ITR
SA
AK
3' OTOF человека (до экзона 48)
bGH pA
ITR

ФИГ.79

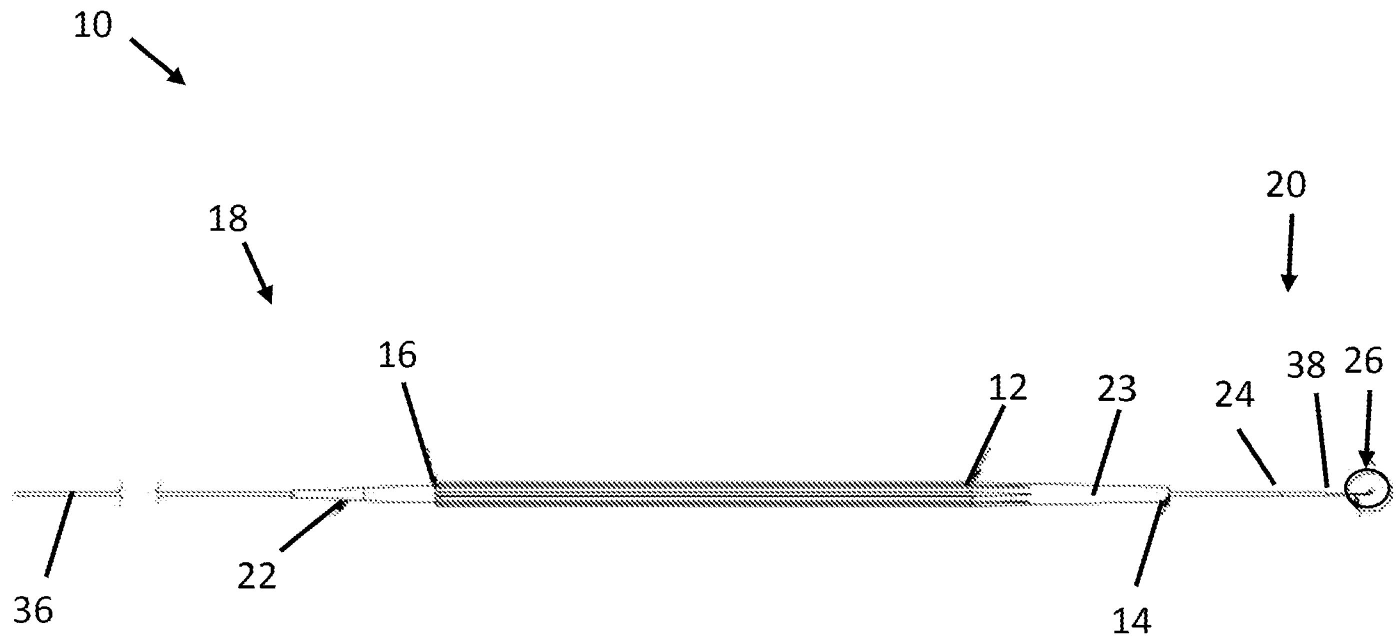


CAG
ITR
CMV
CβA
химерный
интрон
5' OTOF человека (до экзона 21)
SD
AK
ITR

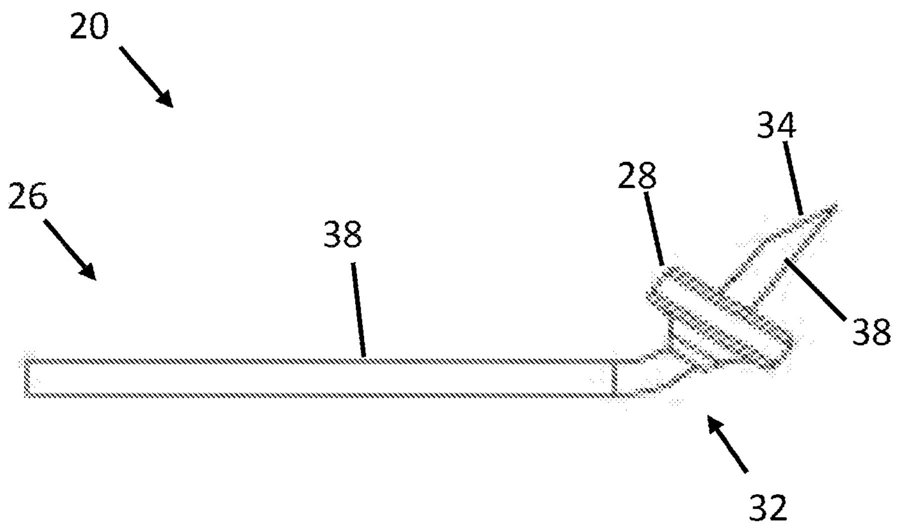
ФИГ.80



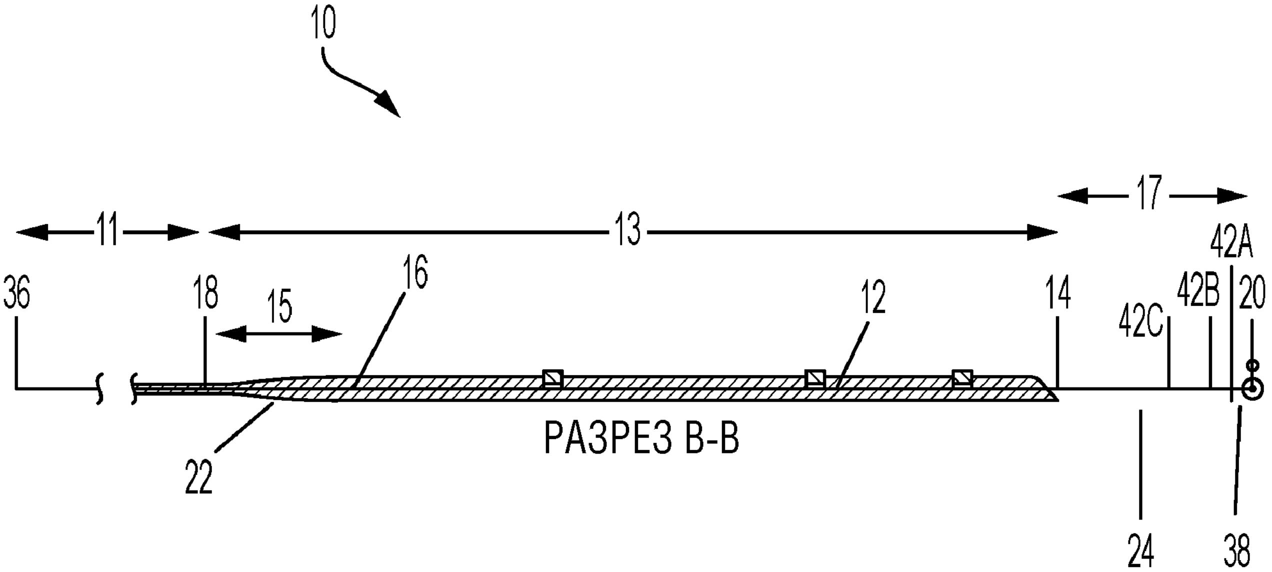
ФИГ.81



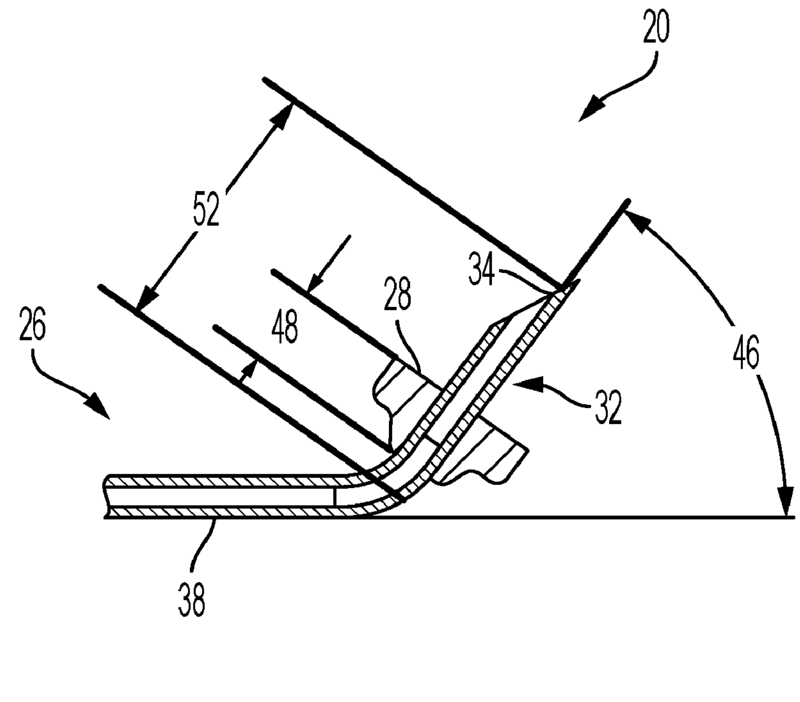
ФИГ.82



ФИГ.83


10
11
13
17
42A
36
18
15
16
12
14
42C
42B
20
РАЗРЕЗ B-B
22
24
38

ФИГ.84


20
52
34
28
46
26
48
32
38