

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042590**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.02

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201791900

(22) Дата подачи заявки
2016.02.19

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЗРЕНИЯ

(31) **1503008.3**

(32) **2015.02.23**

(33) **GB**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/GB2016/050419**

(87) **WO 2016/135457 2016.09.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСЛ БИЗНЕС ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
**Риззи Маттео, Али Робин, Смит
Александр, Нисигути Кодзи (GB)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Хмара М.В., Липатова
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина
В.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С.
(RU)**

(56) **WO-A1-2009127705**

WO-A1-2013124477

WO-A2-2012167109

ELSA LHERITEAU ET AL.: "Successful Gene Therapy in the RPGRIP1-deficient Dog: a Large Model of Cone-Rod Dystrophy", **MOLECULAR THERAPY**, vol. 22, no. 2, 4 October 2013 (2013-10-04), pages 265-277, XP055266023, GB ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2013.232, abstract, figure 2

KOJI M. NISHIGUCHI ET AL.: "Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179", **NATURE COMMUNICATIONS**, vol. 6, 23 January 2015 (2015-01-23), page 6006, XP055266591, DOI: 10.1038/ncomms7006 page 3, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, line 2

XUE HAN ET AL.: "A High-Light Sensitivity Optical Neural Silencer: Development and Application to Optogenetic Control of Non-Human Primate Cortex", **FRONTIERS IN SYSTEMS NEUROSCIENCE**, vol. 5, 13 April 2011 (2011-04-13), XP055265835, DOI: 10.3389/fnsys.2011.00018, the whole document

M.E. BURNS ET AL.: "Lessons from Photoreceptors: Turning Off G-Protein Signaling in Living Cells", **PHYSIOLOGY**, vol. 25, no. 2, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 72-84, XP055266715, US ISSN: 1548-9213, DOI: 10.1152/physiol.00001.2010, cited in the application, figure 1, page 76, right-hand column, paragraph 2, page 81, right-hand column, paragraph 2

(57) Изобретение относится к использованию векторов генной терапии для улучшения зрения путем введения в здоровые фоторецепторные клетки-палочки пациента, страдающего дисфункцией и/или деградацией фоторецепторов-колбочек, нуклеиновой кислоты, кодирующей генный продукт, который является светочувствительным и/или который изменяет эндогенную светочувствительную передачу сигналов в фоторецепторной клетке таким образом, что диапазон интенсивностей освещения, на который реагирует фоторецептор-палочка, увеличивается, и/или увеличивается скорость, с которой фоторецептор-палочка реагирует на свет.

B1**042590****042590****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к использованию векторов генной терапии для улучшения зрения у пациентов.

Уровень техники

У многих видов млекопитающих, включая мышей и людей, количество фоторецепторов-палочек, которые обеспечивают зрение в условиях тусклого света, значительно превосходит количество фоторецепторов-колбочек (Cucio et al., 2000). Тем не менее, в промышленно развитом мире, в котором освещение позволяет колбочкам функционировать в течение всего дня, обеспечиваемое палочками зрение является менее важным. Многие пациенты с нефункционирующими палочками от рождения обнаруживаются лишь случайно и, по сути, не могут распознать своё не соответствующее норме зрение (Dryja, 2000). Напротив, при дисфункции колбочек, пациенты всегда являются симптоматичными и часто страдают дефектом зрения, зависящим от степени дисфункции их колбочек. Однако, в некоторых условиях только (или в основном) колбочки являются неработающими или дисфункциональными, а палочки остаются относительно сохраненными. Например, ахроматопсия представляет собой тяжелую наследственную дистрофию сетчатки с полностью нефункционирующими от рождения колбочками, но, предположительно, с нормально функционирующими палочками (Hess et al., 1986; Nishiguchi et al., 2005). Была обнаружена связь между мутациями в нескольких генах, включая CNGA3 (Kohl et al. 1998); и PDE6C (Chang et al., 2009; Thiadens et al., 2009) и болезнью. Каждый из генов, вызывающих болезнь, кодирует важный компонент каскада фототрансдукции колбочки, который преобразует свет в электрический сигнал, вызывая гиперполяризацию фоторецепторной клетки. При возрастной дистрофии жёлтого пятна (ВДЖП) ухудшение зрения вызвано прежде всего дегенерацией в жёлтом пятне центральной ямки, содержащей большое количество колбочек. Таким образом, пациенты теряют центральное зрение и остроту зрения, но часто имеют относительно хорошо сохраненную периферическую часть жёлтого пятна и, следовательно, имеют некоторое полезное остаточное зрение, которое ограничено малым количеством колбочек за пределами центральной ямки. Палочки очень чувствительны к свету, что позволяет им воспринимать небольшое количество света в условиях сумерек. Колбочки, напротив, менее чувствительны, но способны обрабатывать большое количество света и непрерывно передавать зрительные сигналы при дневном свете.

Это функциональное различие, отчасти, связано с эффективностью аппарата деактивации фотосигналов - ГТФазного комплекса, состоящего из RGS9, R9AP (также известного как RGS9BP) и Gβ5. RGS9 является каталитическим компонентом, который гидролизует ГТФ, связанный с G-белком, тогда как R9AP и Gβ5 являются основными составляющими субъединицами (Burns et al., 2009; Burns et al., 2010). Важно отметить, что R9AP связывает комплекс с мембраной диска в наружном сегменте фоторецептора, где также происходит передача сигнала фототрансдукции (Baseler et al., 2002). Экспрессия R9AP определяет количество ГТФазного комплекса таким образом, что RGS9, продуцированный в избытке по отношению к R9AP, вероятно, быстро расщепляется (Martyemyanov et al., 2009). Избыточной экспрессии R9AP в палочках мыши достаточно для увеличения активности ГТФазы и, по существу, для ускорения их кинетики деактивации, о чем свидетельствуют регистрации сигналов отдельных клеток (Krispel et al., 2006). Экспрессия RGS9 в колбочках оценена как в 10 раз выше, чем в палочках (Cowan et al., 1998; Zhang et al., 2003). Это лежит в основе свойства колбочек быстро восстанавливаться после воздействия света и, таким образом, сохранять функциональность при непрерывном световом стимуле. Это также позволяет колбочкам реагировать на более быстрое возбуждение. Действительно, с клинической точки зрения пациенты с задержкой деактивации фототрансдукционного каскада, вызванной генетическими дефектами mRGS9 или R9AP, то есть с брадиопсией, имеют серьёзное нарушение обеспечиваемого колбочками зрения, включая дневную слепоту и сниженную способность видеть движущиеся объекты (Nishiguchi et al., 2004; Michaelides et al., 2010). В тоже время, обеспечиваемое палочками зрение менее подвержено влиянию той же мутации.

Некоторые заболевания дегенерации жёлтого пятна, такие как возрастная дистрофия жёлтого пятна (ВДЖП) и наследственные заболевания дегенерации жёлтого пятна, также показывают дисфункцию колбочек, но нормальную или менее ослабленную функцию палочек. Дегенерация жёлтого пятна является ведущей причиной слепоты в развитом мире, и, поскольку ее встречаемость возрастает в четыре раза за каждое десятилетие жизни, ожидается, что количество случаев ВДЖП будет расти в ближайшие годы по мере увеличения продолжительности жизни. Лекарственные препараты для лечения ВДЖП уже составляют более 1% всего бюджета лекарств Национальной службы здравоохранения Великобритании. В то время как пациенты с прогрессирующей ВДЖП могут быть обучены фиксированию вне центральной ямки, низкая скорость восстановления и низкий порог "обесцвечивания" (bleaching - обесцвечивание - изомеризация 11-цис-ретиная в транс-ретиаль приводящая к конформационным изменениям в родопсине и последующему высвобождению транс-ретиная, при этом фотопигмент теряет цвет) палочек ограничивают качество получаемого в результате зрения.

Сущность изобретения

Используя мышей с нефункционирующими колбочками, мы продемонстрировали, что AAV-опосредованная избыточная экспрессия RGS9-якорного белка (R9AP), критического компонента ГТФазного комплекса, который опосредует деактивацию каскада фототрансдукции, приводит к фотодесенситилизации и "фотопическому сдвигу" создаваемой палочками электроретинограммы. Лечение позволяет палочкам реагировать на более яркий свет (до $\sim 2,0 \log$) в отличие от непрошедших лечение клеток, в счет скопической функции (сумеречного зрения). Чип-мультieleктродные измерения с применением прошедших лечение сетчаток показали, что ганглионарные клетки сетчатки также отображали "фотопический сдвиг" палочек, демонстрируя ступенчато изменяющиеся ответные реакции при уровнях фотопического (дневного) света. Функция контрастной чувствительности, измеренная путем количественного определения следящих движений головы в ответ на вращающиеся синусоидальные решетки, показала улучшение чувствительности в 25 раз при условиях освещения в помещении и более быстрое реагирование на повторяющиеся раздражители. Кроме того, биохимическое измерение количеств обесцвечиваемого родопсина у этих мышей показало, что цикл превращений родопсина не ограничивал функцию палочек.

Мы также экспрессировали свето-управляемый протонный насос ArchT (Han et al., 2011) в фоторецепторах-палочках. Частицы AAV8, несущие ArchT-EGFP под контролем промотора родопсина (Rho), вводили субретинально взрослым мышам. Экспрессия Rho-ArchT-EGFP ограничивалась мембраной фоторецепторов-палочек. Экспрессия ArchT делала возможной чрезвычайно быстрые световые реакции, в то время как собственная реакция палочек сохранялась и была сопоставима с наблюдаемой в нетрансфицированных фоторецепторах-палочках. В целом, экспрессия ArchT не изменяла способность фоторецепторов-палочек реагировать на скопические стимулы, но она предоставляла дополнительную способность реагировать путем быстрых, не связанных с обесцвечиванием ответных реакций на более высокие уровни освещенности. Мы также обнаружили, что трансдуцированные палочки могли надежно выдерживать эту быструю "колбочкоподобную" передачу сигналов, что проявлялось в том, что палочки, экспрессирующие ArchT, запускали устойчивую генерацию импульсов ганглионарными клетками сетчатки (ГКС), возникающую при высоких интенсивностях светового излучения и на частотах, приближающихся к частотам фоторецепторов-колбочек. Экспрессия Rho-ArchT-EGFP у мышей CNGA3^{-/-} и PDE6C^{-/-}, не обладающих обеспечиваемым колбочками зрением, также увеличивала чувствительность этих мышей к яркому световому воздействию и обеспечивала быстрое зрение этим мышам.

Максимальная частота воздействия, которую могли улавливать мыши, экспрессирующие ArchT, была такой же, как у фоторецепторов-колбочек.

Вместе эти результаты показывают, что после трансдукции здоровых фоторецепторов-палочек генами, кодирующими или светочувствительные белки, характерные для колбочек, или генами, кодирующими молекулы, которые увеличивают скорость эндогенного сигнального механизма палочек, палочки ведут себя более похоже на колбочки и, следовательно, могут компенсировать дисфункцию колбочек. Это имеет значение для лечения ряда нарушений зрения, при которых функция колбочек снижается, но по меньшей мере сохраняются некоторые здоровые палочки. Это резко отличается от предыдущих подходов (Busskamp et al., 2010; публикация патента США № 2012258530), в которых целью было восстановление утраченной функции колбочек. Изменение функционирования палочек в соответствии с настоящим изобретением является более целесообразным поскольку случаи, когда колбочки являются нефункциональными, но могут быть восстановлены (например, на ранних стадиях дегенерации сетчатки, когда функция фоторецептора утрачивается, но фоторецептор-биполярный синапс может быть неповрежденным) являются редкими, тогда как случаи, когда дисфункция колбочек является более тяжелой или ухудшенной, и не может быть восстановлена, или когда колбочки полностью утрачены, но все же, по меньшей мере, сохранены некоторые здоровые фоторецепторы-палочки, являются часто встречающимися (см. выше). Кроме того, данное изобретение позволяет создать "псевдо-центральную ямку", небольшой участок колбочко-подобных палочек, тем самым улучшая зрение в условиях, когда колбочки центральной ямки были утрачены или являются дисфункциональными.

Таким образом, в изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, который является светочувствительным и/или улучшает эндогенную светочувствительную передачу сигнала в фоторецепторной клетке, для применения в способе улучшения зрения у пациента с дисфункцией и/или деградацией фоторецепторов-колбочек, путем введения указанной нуклеиновой кислоты в здоровые фоторецепторы-палочки в сетчатке пациента и экспрессии указанного генного продукта в них же, таким образом, что диапазон интенсивностей освещения, на который реагирует фоторецептор-палочка, увеличивается, и/или увеличивается скорость, с которой фоторецептор-палочка реагирует на свет.

В изобретении также предложен вектор, как определено выше, клетка-хозяин, содержащая указанный вектор, и способы лечения, осуществляемые с помощью такого вектора.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: экспрессия ArchT в фоторецепторах-палочках приводит к появлению быстрых, вызываемых светом токов.

А) Верхние панели: AAV8-опосредованная трансдукция ArchT-EGFP (зеленый, см. левые панели) под контролем промотора родопсина. Не наблюдается совпадений с колбочками (фиолетовый: арестин колбочек, см. средние панели, белый: DAPI, см. правые панели). Нижние панели: специфичность экспрессии также наблюдается на уровне синапсов.

Б) ArchT-EGFP локализован на мембране фоторецепторов-палочек, включая внутренние и наружный сегменты.

В) Количественная оценка флуоресценции в концах палочек, экспрессирующих ArchT-EGFP (зеленый, левый пик) и положительных на арестин колбочек концах колбочек (фиолетовый, правый пик), показывает две различные полосы, соответствующие подслою, где находятся синапсы палочек и колбочек соответственно (n=22).

Г) Записи с одиночных клеток, с клеточных тел ArchT-экспрессирующих фоторецепторов-палочек. Токи, опосредуемые собственной фототрансдукцией палочек (верхняя кривая) в ответ на 10 мс 530 нм световые импульсы (зеленые, см. вертикальные полосы) были сохранены. Токи, генерируемые ArchT, были быстрее (нижняя кривая). Полоски масштаба: а) верхние панели: 50 мкм; а) нижние панели и б): 10 мкм.

Фиг. 2: экспрессия ArchT вызывает высокочастотные ответные реакции в палочках и быструю передачу сигнала на ганглионарные клетки сетчатки.

А) Свойственные палочкам, вызванные светом токи в неинъектированных сетчатках C57BL6.

Б) Токи, опосредуемые ArchT, способны следовать гораздо более высоким частотам стимуляции.

В) Ответные реакции ограничены по времени подачи стимула (зеленые вертикальные полосы).

Г) Экспрессирующие ArchT палочки реагируют на частоту стимуляции вплоть до 80 Гц без прерывания, тогда как свойственные палочкам ответные реакции, спадают при ~20 Гц.

Д) Сводные данные, показывающие, что экспрессия ArchT не изменяет собственный отклик фоторецепторов-палочек, в то время как ArchT-опосредованные ответные реакции начинаются с более ярких уровней освещенности.

Е) Чип-мультieleктродные записи ArchT-экспрессирующих сетчаток PDE6C-/. Свойственные палочкам ответные реакции не смогли вызвать надежную генерацию импульсов ганглионарными клетками сетчатки выше 20 Гц. Напротив, ArchT-опосредованная активация палочек, приводила к быстрой генерации импульсов ганглионарными клетками сетчатки до уровней, сравнимых с фоторецепторами-колбочками.

Фиг. 3: ArchT-опосредованная активация палочек запускает поведенческий ответ для световых стимулов высокой интенсивности.

А) Верхние панели: схематический чертеж для выработки условных рефлексов страхом. Вкратце, зрительный стимул сочетался с электрическим ударом. 24 ч спустя, поведение замиранья было протестировано в новых условиях. Нижние панели: неинъектированные мыши CNGA3-/- и PDE6C-/- не смогли обучиться заданию (левые наборы полос на каждом графике). Тем не менее, экспрессия ArchT успешно запускала поведение замиранья у мышей (правые наборы полос на каждом графике).

Б) Оптомоторное тестирование. Экспрессирующие ArchT мыши были способны следить за стимулами на частотах, сравнимых с теми, на которых стимулы надежно отслеживаются колбочками.

Фиг. 4: AAV-опосредованная избыточная экспрессия R9AP в палочках и ускоренная деактивация а-волны у мышей Cnga3-/-.

А. Увеличенная экспрессия RGS9 в глазе Cnga3-/-, подвергавшемся лечению с помощью rAAV2/8.Rho.mR9ap. Избыточная экспрессия R9AP приводит к увеличению иммунореактивности по отношению к RGS9 (красный) по всему фоторецепторному слою в прошедшем лечении глазу (слева) по сравнению с непрошедшим лечение (справа). Вестерн-блоттинг демонстрирует повышенную экспрессию RGS9 как в сетчатке, так и в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС) при избыточной экспрессии R9AP (снизу) в глазе. Небольшое количество белка RGS9 также было обнаружено в ПЭС прошедшего лечение глаза. Это может отражать "выход с под контроля" избыточного белка, содержащегося в фагоцитированной мембране диска. Полоска масштаба обозначает 25 мкм.

Б. Повышенная скорость восстановления амплитуды а-волны в глазе Cnga3-/-, прошедших лечение с помощью rAAV2/8.Rho.mR9ap и rAAV2/8.CMV.mR9ap. Репрезентативные кривые ЭРГ для пробной вспышки (черные кривые, см. кривые с пиком в середине временного периода) и для 2-й вспышки (красные кривые), представленные в интервалах между стимулами (ИМС) в течение 2 с, из прошедших лечение (верхних) и непрошедших лечение (нижних) глаз от одного и того же животного. Обратите внимание, что вторая вспышка дает небольшую а-волну (стрелка), которая хорошо видна в прошедшем лечении глазу, тогда как а-волна не видна (стрелка) в непрошедшем лечении глазу (второй из пары). График восстановления а-волны при различных ИМС в прошедших и непрошедших лечение глазах. Глаза, инъецированные rAAV2/8.CMV.mR9ap (n = 5) или rAAV2/8.Rho.mR9ap (n = 7), имеют более быструю кинетику восстановления, чем непрошедший лечение глаз (n = 5), что наиболее заметно при более коротких

ИМС. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ИЭ: избыточная экспрессия.

Фиг. 5: приобретение фотопической функции палочками посредством избыточной экспрессии R9AP у мышей Cnga3^{-/-}.

А. Повышение порога ответной реакции и фотопический сдвиг 6 Гц ЭРГ посредством избыточной экспрессии R9AP в палочках Cnga3^{-/-} мышей. Репрезентативные кривые 6 Гц ЭРГ от мыши Cnga3^{-/-}, у которой один глаз лечили gAAV2/8.CMV.mR9ap, а другой глаз оставался непрошедшим лечение (верхняя панель). Кривые ЭРГ выравнены начиная с ответных реакций на самую слабую вспышку ($-6,0 \log \text{ кд с/м}^2$) и до ответных реакций на самую яркую вспышку ($2,0 \log \text{ кд с/м}^2$, низ) сверху вниз с шагом $0,5 \log \text{ кд с/м}^2$. Обратите внимание, что нижний порог интенсивности вспышки, при которой возникают ответные реакции, увеличился, что связано с повышенным порогом ответных реакций для более ярких вспышек. Это приводит к "фотопическому сдвигу" функции сетчатки глаза, прошедшего лечение с помощью gAAV2/8.CMV.mR9ap. Обобщение результатов 6 Гц ЭРГ, демонстрирующих фотопический сдвиг функции сетчатки после лечения с помощью gAAV2/8.CMV.mR9ap или gAAV2/8.Rho.mR9ap (нижняя панель). ЭРГ ответных реакций, полученные от мышей Gnat1^{-/-}, дефективных по функции палочек, представляют собой опосредованную колбочками функцию. Между тем, ответные реакции мышей C57BL6 получены как для фоторецепторов-палочек, так и фоторецепторов-колбочек. Данные представлены как % амплитуды относительно максимальной ответной реакции и представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ЭРГ записывали для мышей Cnga3^{-/-}, прошедших лечение с помощью gAAV2/8.CMV.mR9ap (Cnga3^{-/-} CMV.R9ap; N=8), мышей Cnga3^{-/-}, прошедших лечение с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap (Cnga3^{-/-} Rho.R9ap; N=6), непрошедших лечение мышей Cnga3^{-/-} (непрошедшие лечение Cnga3^{-/-}, N=8), непрошедших лечение мышей Gnat1^{-/-} (Gnat1^{-/-} непрошедшие лечение, N=6) и непрошедших лечение мышей C57BL6 (C57BL6 непрошедшие лечение, N=6).

Б. Увеличенные ответные реакции сетчатки на длинные вспышки у глаза Cnga3^{-/-}, прошедшего лечение gAAV2/8.CMV.mR9ap. Незакрашенный прямоугольник обозначает длительность вспышки. Обратите внимание, что в глазу, прошедшем лечение gAAV2/8.CMV.mR9ap, ответные реакции обнаруживаются с увеличением продолжительности светового стимула. Напротив, непрошедший лечение контралатеральный глаз практически не демонстрирует ответных реакций, когда проводят запись в тоже время при идентичных условиях.

В. Усиление функции сетчатки при фотопических условиях в глазах Cnga3^{-/-}, прошедших лечение gAAV2/8.CMV.mR9ap. Обратите внимание, что прошедший лечение глаз демонстрирует ответные реакции в условиях фотопической записи (белый фоновый свет 20 кд/м^2), тогда как непрошедший лечение контралатеральный глаз, записанный одновременно, остается невосприимчивым.

Фиг. 6: эффективная передача измененного сигнала фоторецептора в биполярные клетки в глазах, избыточно экспрессирующих R9AP.

А. Репрезентативные кривые ЭРГ. ЭРГ записывали после инъекции gAAV2/8.CMV.mR9ap (красная кривая, нижняя кривая) у мыши Cnga3^{-/-} с использованием насыщающей вспышки ($1,9 \log \text{ кд с/м}^2$). Контралатеральный глаз служил непрошедшим лечение контролем (черная кривая, верхняя кривая).

Б. Задержанная активация биполярных клеток в ответ на вспышку. Время до пика а-волны и b-волны измерялось по ЭРГ ответных реакций в ответ на насыщающую вспышку ($1,9 \log \text{ кд с/м}^2$) в прошедших лечение и непрошедших лечение глазах.

В. Кривая интенсивности ответных реакций для амплитуд а-волны и b-волны, записанная у мышей Cnga3^{-/-} (N=5) с одним глазом, который лечили с помощью gAAV2/8.CMV.mR9ap (красные кривые), и другим глазом, который оставался непрошедшим лечение (черные кривые). Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ИЭ: избыточная экспрессия.

Фиг. 7: приобретение устойчивого зрительного восприятия после избыточной экспрессии R9AP у мышей Cnga3^{-/-}.

А. Улучшенная функция контрастной чувствительности, измеренная с помощью оптокинетических ответных реакций. У мышей Cnga3^{-/-}, левый глаз которых лечили с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap, функция контрастной чувствительности (ФКЧ) была дифференциально измерена по отслеживающим движениям головы по часовой стрелке (представляющим прошедший лечение левый глаз) и против часовой стрелки (представляющим непрошедший лечение правый глаз) против синусоидальных решеток. ФКЧ для прошедших лечение глаз (красная кривая) была лучше, чем та же у непрошедших лечение глаз (синяя кривая), которая была аналогична таковой для нетронутых мышей Cnga3^{-/-} (черная кривая, среднее для обоих глаз). Обратите внимание, что ФКЧ для прошедшего лечения глаза эквивалентен, если не немного лучше ФКЧ нетронутых контролей дикого типа (зеленый, среднее для обоих глаз). N=5 для всех групп. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ИЭ: избыточная экспрессия.

Б. Устойчивые уровни родопсина после длительного воздействия оптомоторного теста. Репрезентативная запись оптического поглощения глазного образца с использованием сканирующего спектрофотометра (левая панель внутри зеленой пунктирной рамки). Вычитание из поглощения глазных образцов, измеренного после полного фотообесцвечивания (синяя кривая, верхняя кривая между 300 и 400 нм),

поглощения глазных образцов, измеренного до полного фотообесцвечивания (красная кривая) показало, что $\lambda_{\text{мин}}$ достигает пика при примерно 380 нм, что соответствует высвобожденным фотопродуктам, в сочетании с λ_{max} достигающим пика при примерно 500 нм, что представляет собой количество обесцвеченного родопсина в образце (правая панель внутри зеленой пунктирной рамки). Скорость обесцвечивания родопсина оценивали путем измерения разностного спектра (λ_{max}) в полностью расширенных глазах, прошедших лечение или не прошедших лечение с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap у мышей Cnga3^{-/-} после 5-минутного воздействия белого света 7,0 мВт (нижний левый, среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего). Количество родопсина измеряли также после экспонирования мышей Cnga3^{-/-} оптомоторному тесту в течение вплоть до 120 мин (справа внизу; N=3 для каждой временной точки) после односторонней инъекции gAAV2/8.Rho.mR9ap. Серая область показывает количества родопсина (среднее $\pm$ стандартное отклонение), зарегистрированные на нетронутых мышцах Cnga3^{-/-} (N=8) после темновой адаптации в течение ночи. Пунктирная линия указывает среднее значение. Обратите внимание, что количество родопсина остается стабильным в течение как минимум 2 ч как в глазах, прошедших лечение с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap, так и в не прошедших лечение глазах мышей Cnga3^{-/-}. Данные с планками погрешности были представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Фиг. 8: избыточная экспрессия R9AP увеличивает скорость восстановления фотоотклика палочек у мышей Pde6c^{-/-}.

Постоянная времени (σ) для 50% восстановления амплитуды а-волны была уменьшена на ~50% в глазах Pde6c^{-/-}, инъецированных gAAV2/8.CMV.mR9ap ($\sigma = \sim 5,75$ с) по сравнению с не прошедшими лечение контралатеральными глазами ($\sigma = \sim 11,46$ с), что согласуется с ускоренной деактивацией фототрансдукции после лечения. N=6. Данные с планками погрешности были представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Фиг. 9: избыточная экспрессия R9AP приводит к "фотопическому сдвигу" кривой интенсивности ответной реакции у мышей Pde6c^{-/-}.

Глаза, инъецированные gAAV2/8.CMV.mR9ap, показали фотопический сдвиг 6 Гц ЭРГ ответных реакций в ответ на увеличивающиеся интенсивности вспышки по сравнению с не прошедшими лечение контралатеральными глазами у мышей Pde6c^{-/-} (N=6). Данные представлены как % амплитуды относительно максимальной ответной реакции и представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Фиг. 10: устойчивый эффект избыточной экспрессии R9AP без четких доказательств дегенерации сетчатки через 5 месяцев после инъекции gAAV2/8.CMV.mR9ap у мышей Cnga3^{-/-}.

Профиль ответной реакции, нормализованный по максимальной амплитуде, подтвердил наличие "фотопического сдвига" кривой интенсивности ответной реакции в ответ на 6 Гц вспышки (сверху). Те же данные без нормализации не предоставили доказательства уменьшения амплитуд в прошедшем лечении глазу (снизу). N=5. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Фиг. 11: Обработка мышей дикого типа с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap не продемонстрировала очевидного влияния на 6 Гц ЭРГ кривую интенсивности ответной реакции.

Глаза, прошедшие лечение с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap, не показали сдвига в 6 Гц ЭРГ кривой интенсивности ответной реакции по сравнению с таковой для не прошедших лечение контралатеральных глаз у мышей C57BL6 (N=5). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Фиг. 12: отсутствие усиления зрительного восприятия после избыточной экспрессии R9AP у мышей C57BL6.

У мышей C57BL6, только левый глаз которых лечили с помощью gAAV2/8.Rho.mR9ap, функция контрастной чувствительности (ФКЧ) была дифференциально измерена по отслеживающим движениям головы по часовой стрелке (представляющим прошедший лечение левый глаз) и против часовой стрелки (представляющим не прошедший лечение правый глаз) против синусоидальных решеток. ФКЧ как для прошедших лечение глаз (розовая кривая), так и не прошедших лечение глаз (голубая кривая) показали похожие результаты, которые были аналогичны таковым для нетронутых мышей C57BL6 (зеленая кривая, среднее для обоих глаз). N=5 для всех групп. Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. ИЭ: избыточная экспрессия.

Подробное описание сущности изобретения

Вектор по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, экспрессия которой производит продукт гена, обычно белок, который будет осуществлять лечение как описано в данном документе, функционально связанного с промотором для формирования экспрессионной кассеты.

Нуклеиновые кислоты и генные продукты.

Вектор по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, который является светочувствительным и/или который изменяет эндогенную светочувствительную передачу сигналов в фоторецепторной клетке и вынуждает палочку, трансдуцированную нуклеиновой кислотой по изобретению, вести себя более похоже на колбочку путем расширения диапазона интенсивностей освещения, на который реагирует фоторецептор-палочка, и/или увеличения скорости, с которой фоторецептор-палочка реагирует на свет. Таким образом, сам белок может быть напрямую светочувствительным, например, он может изменять проводимость мембраны в палочках таким образом, что это приводит к

гиперполяризации (исходящее протекание тока) при световой стимуляции. Такими белками могут быть, например, светочувствительные или светорегулируемые G-связанные мембранные белки, ионные каналы, ионные насосы или ионные транспортеры. Предпочтительные светочувствительные белки включают ArchT, Jaws (кракшейлородопсин - cruxhalorhodopsin) (Chuong et al., 2014) и iClC2. Альтернативно, белок сам по себе может не быть напрямую чувствительным к свету, но может непрямо изменять эндогенную светочувствительную передачу сигнала в фоторецепторе-палочке. Примерами таких белков являются элементы комплекса RGS9, в частности R9AP (также известный как RGS9BP) и GB5. Альтернативно, нуклеиновая кислота может кодировать любой другой генный продукт, который увеличивает скорость эндогенного сигнального механизма палочки. Во всех этих случаях последовательность может кодировать белок дикого типа, или мутантную, или модифицированную, или усеченную версию, которая сохраняет активность белка дикого типа. Нуклеиновая кислота также может быть кодон-оптимизированной для экспрессии в целевом типе клеток.

После экспрессии генного продукта, палочки будут демонстрировать более сильное и/или более быстрое изменение в ответ на световое воздействие, чем нетрансдуцированные палочки, при более высокой, чем обычно, интенсивности света. Примеры включают улучшенную интенсивность изменения и/или более быструю кинетику активации/инактивации. Поэтому палочки, трансдуцированные в соответствии с изобретением, будут, вследствие этого, реагировать более сильно и/или быстро на освещение в мезопическом и/или фотопическом диапазоне, чем нетрансдуцированные палочки. Предпочтительно, ответ палочек на условия скотопической освещенности не затронут или не существенно затронут, т.е. палочки получают способность реагировать сильно и/или быстро на более яркий свет, не теряя способности реагировать на тусклый свет.

Промоторы и другие регуляторные элементы.

В конструкции экспрессии, нуклеиновая кислота, кодирующая генный продукт, обычно функционально связана с промотором. Промотор может быть конститутивным, но желательно представлять собой фоторецептор-специфичный или фоторецептор-предпочтительный промотор, более желательно специфичный или предпочтительный для палочек промотор, такой как промотор родопсина (Rho), промотор белка с лейциновой застежкой, специфичного для нейронов сетчатки (NRL), или промотор фосфодиэстеразы 6B (PDE6B). Область промотора, включенная в кассету экспрессии, может иметь любую длину до тех пор, пока он является эффективным в управлении экспрессией генного продукта, желательно фоторецептор-специфичной или фоторецептор-предпочтительной экспрессией, или специфичной или предпочтительной для палочек экспрессией.

Под фоторецептор-специфичным промотором подразумевается промотор, который управляет экспрессией только или, в большей степени, только в фоторецепторах, например, такой, который усиливает экспрессию по меньшей мере в сто раз в фоторецепторах, по сравнению с любым другим типом клеток. Под специфичным для палочек промотором подразумевается промотор, который управляет экспрессией только или, в большей степени, только в фоторецепторах, например, такой, который усиливает экспрессию по меньшей мере в сто раз в фоторецепторах, по сравнению с любым другим типом клеток, включая колбочки. Под фоторецептор-предпочтительным промотором подразумевается промотор, который запускает экспрессию предпочтительно в фоторецепторах, но также может в некоторой степени управлять экспрессией в других тканях, например, такой, который усиливает экспрессию по меньшей мере двукратно, по меньшей мере пятикратно, по меньшей мере десятикратно, по меньшей мере двадцатикратно или по меньшей мере пятидесятикратно в фоторецепторах, по сравнению с любым другим типом клеток. Под предпочтительным для палочек промотором подразумевается промотор, который управляет экспрессией предпочтительно в фоторецепторах, но также может в некоторой степени управлять экспрессией в других тканях, например, такой, который усиливает экспрессию по меньшей мере двукратно, по меньшей мере пятикратно, по меньшей мере десятикратно, по меньшей мере двадцатикратно или по меньшей мере пятидесятикратно в фоторецепторах, по сравнению с любым другим типом клеток, включая колбочки.

Также может присутствовать один или несколько других регуляторных элементов, таких как энхансеры, а также промотор.

Векторы.

Вектор по изобретению может быть любого типа, например, он может быть плазмидным вектором или мини-кольцевой ДНК.

Как правило, векторы по изобретению, однако, являются вирусными векторами. Вирусный вектор может быть, например, основан на вирусе простого герпеса, аденовирусе или лентивирусе. Вирусным вектором может быть вектор аденоассоциированного вируса (AAV) или его производное. Производное вирусного вектора может быть химерным, перетасованным или капсидным модифицированным производным.

Вирусный вектор может содержать геном AAV из естественно полученного серотипа, изолята или клады AAV. Серотип может быть, например, AAV2, AAV5 или AAV8.

Эффективность генной терапии в целом, как правило, зависит от адекватной и эффективной доставки вложенной ДНК. Этот процесс обычно опосредуется вирусными векторами. В генной терапии обычно

используются аденоассоциированные вирусы (AAV), являющиеся членами семейства парвовирусов. Дикий тип AAV, содержащий вирусные гены, вставляет свой геномный материал в хромосому 19 клетки-хозяина. Одноцепочечный ДНК-геном AAV содержит два инвертированных терминальных повтора (ITR) и две открытые рамки считывания, содержащие структурные ("cap") и упаковочные ("тер") гены.

В терапевтических целях единственными последовательностями, требуемыми *in cis*, помимо терапевтического гена, являются ITR. Поэтому вирус AAV модифицируют: вирусные гены удаляют из генома, продуцируя рекомбинантный AAV (гAAV). Этот содержит только терапевтический ген, два ITR. Удаление вирусных генов делает гAAV неспособным активно вставлять свой геном в ДНК клетки-хозяина. Вместо этого геномы гAAV сливаются через ITR, образуя кольцевые, эписомальные структуры, или вставляются в ранее существовавшие хромосомные разрывы. Для продуцирования вируса структурные и упаковочные гены, которые теперь удалены из гAAV, поставляются *in trans*, в форме вспомогательной плазмиды. AAV является особенно привлекательным вектором, поскольку он в целом, как правило, является непатогенным; большинство людей были инфицированы этим вирусом в течение их жизни без каких-либо побочных эффектов. Иммунная неприкосновенность ткани глаза, результат анатомических барьеров и иммуномодулирующих факторов, делает глаз в значительной степени не подлежащим неблагоприятным иммунологическим реакциям, которые могут быть вызваны AAV в других тканях (Taylor 2009).

AAV-векторы ограничены относительно небольшой упаковочной емкостью примерно 4,8 тис.п.н. и медленным появлением экспрессии после трансдукции. Несмотря на эти незначительные недостатки, AAV стал наиболее часто используемым вирусным вектором для генной терапии сетчатки.

Большинство векторных конструкций основаны на серотипе 2 AAV (AAV2). AAV2 связывается с клетками-мишенями через рецептор протеогликан гепарин сульфат. Геном AAV2, как и всех серотипов AAV, может быть заключен в ряд различных капсидных белков. AAV2 может быть упакован в его естественный капсид AAV2 (AAV2/2) или он может быть псевдотипирован другими капсидами (например, геном AAV2 в капсиде AAV1, AAV2/1, геном AAV2 в капсиде AAV5, геном AAV2/5 и AAV2 в капсиде AAV8; AAV2/8).

гAAV трансдуцирует клетки путем серотип-специфического рецептор-опосредованного эндоцитоза. Основным фактором, влияющим на кинетику экспрессии трансгена гAAV, является скорость сбрасывания капсида вирусной частицы в эндосоме. Это, в свою очередь, зависит от типа капсида, охватывающего генетический материал (там же). После сбрасывания капсида, линейный одноцепочечный геном гAAV стабилизируется путем образования двухцепочечной молекулы посредством синтеза *de novo* комплементарной цепи. Использование самокомплементарной ДНК может обойти эту стадию путем продуцирования двухцепочечной трансгенной ДНК. Natkunarajah et al. (2008) обнаружили, что самокомплементарная генная экспрессия AAV2/8 имеет более быстрое начало и более высокую амплитуду по сравнению с одноцепочечным AAV2/8. Таким образом, путем обхода временной задержки, связанной с синтезом второй цепи, уровни генной экспрессии увеличиваются по сравнению с экспрессией трансгена из стандартных одноцепочечных конструкций. Последующие исследования, исследующие влияние самокомплементарной ДНК в других псевдотипах AAV (например, AAV2/5), дали аналогичные результаты. Одно предостережение для этого метода заключается в том, что, поскольку AAV имеет упаковочную емкость около 4,8 тис.п.н., самокомплементарный рекомбинантный геном должен быть соответственно подобранного размера (т.е. 2,3 тис.п.н. или менее).

В дополнение к изменению упаковочной емкости, псевдотипирование генома AAV2 с помощью других капсидов AAV может изменить клеточную специфичность и кинетику трансгенной экспрессии. Сообщается, что AAV2/8 трансдуцирует фоторецепторы более эффективно, чем AAV2/2 или AAV2/5 (Natkunarajah et al., 2008).

Следовательно, вектор по изобретению может содержать геном аденоассоциированного вируса (AAV) или его производное.

Геном AAV представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональные элементы, необходимые для продуцирования вирусной частицы AAV. Эти функциональные элементы включают те, которые работают в цикле репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине, включая инкапсуляцию генома AAV в вирусную частицу AAV. Встречающиеся в природе вирусы AAV являются репликативно-неполноценными и полагаются на предоставление вспомогательных функций *in trans* для завершения цикла репликации и упаковки. В соответствии с этим, и с дополнительным удалением генов *тер* и *сар* AAV, геном AAV вектора по изобретению является репликативно-неполноценным.

Геном AAV может быть в одноцепочечной форме, как смысловой, так и антисмысловой, или, альтернативно, в двухцепочечной форме. Использование двухцепочечной формы позволяет обходить стадию репликации ДНК в клетке-мишени и, таким образом, ускорять экспрессию трансгена. Геном AAV может являться геномом из любого серотипа или изолята или клады AAV природного происхождения. Как известно специалисту в данной области техники, вирусы AAV, встречающиеся в природе, могут быть классифицированы в соответствии с различными биологическими системами.

Обычно вирусы AAV упоминаются в терминах их серотипа. Серотип соответствует варианту подтипа AAV, который благодаря своему профилю экспрессии поверхностных антигенов капсида имеет ха-

ракторную реакционную способность, которая может быть использована для того, чтобы отличить его от другого подвида. Как правило, вирус, имеющий специфический серотип AAV, не эффективно вступает в перекрестную реакцию с нейтрализующими антителами, специфичными к любому другому серотипу AAV. Серотипы AAV включают AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11, а также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, недавно идентифицированные в мозге приматов. В векторах по изобретению геном может быть получен из любого серотипа AAV. Капсид также может быть получен из любого серотипа AAV. Геном и капсид могут быть получены из одного и того же серотипа, или разных серотипов.

Предпочтительно, чтобы геном в векторах по изобретению был получен из серотипа 2 AAV (AAV2), серотипа 4 AAV (AAV4), серотипа 5 AAV (AAV5) или серотипа 8 AAV (AAV8). Наиболее предпочтительно, чтобы геном был получен из AAV2, причем, другие серотипы, представляющие особый интерес для использования в изобретении, включают AAV4, AAV5 и AAV8, которые эффективно трансдуцируют глазную ткань, такую как пигментный эпителий сетчатки. Предпочтительно, чтобы капсид был получен из AAV5 или AAV8, в первую очередь из AAV8.

Обзоры серотипов AAV можно найти в Choi et al. (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310) и Wu et al. (Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327). Последовательности геномов AAV или элементов геномов AAV, включая последовательности ITR, генов гер или сар для применения в изобретении, могут быть получены по следующим идентификационным номерам для последовательностей полных геномов AAV: адено-ассоциированный вирус 1 NC_002077, AF063497; адено-ассоциированный вирус 2 NC_001401; адено-ассоциированный вирус 3 NC_001729; адено-ассоциированный вирус 3B NC_001863; адено-ассоциированный вирус 4 NC_001829; адено-ассоциированный вирус 5 Y18065, AF085716; адено-ассоциированный вирус 6 NC_001862; птичий AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; штамм птичьего AAV DA-1 NC_006263, AY629583; бычий AAV NC_005889, AY388617.

Вирусы AAV также могут упоминаться в терминах клад или клонов. Это относится к филогенетической взаимосвязи полученных из природы вирусов AAV и, как правило, к филогенетической группе вирусов AAV, происхождение которых можно проследить до общего предка, и которая включает все его потомки. Кроме того, вирусы AAV могут упоминаться в терминах специфического изолята, то есть генетического изолята определенного вируса AAV, обнаруженного в природе. Термин "генетический изолят" описывает популяцию вирусов AAV, которая претерпела ограниченное генетическое смешивание с другими встречающимися в природе вирусами AAV, тем самым определяя узнаваемо отдельную популяцию на генетическом уровне.

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

клада А: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609,

клада В: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu. 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,

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

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

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

клада Е: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, Clonal Isolate AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

Специалист в данной области техники может выбрать подходящий серотип, кладу, клон или изолят AAV для применения в настоящем изобретении исходя из известного уровня техники. Однако следует понимать, что изобретение также охватывает использование генома AAV других серотипов, которые еще не были идентифицированы или охарактеризованы. Серотип AAV определяет тканевую специфичность инфекции (или тропизм) вируса AAV. Соответственно, предпочтительными серотипами AAV для применения в качестве вирусов AAV, вводимых пациентам в соответствии с изобретением, являются те, ко-

которые имеют природный тропизм к фоторецепторам-палочкам или высокую эффективность заражения фоторецепторов-палочек.

Как правило, геном AAV естественно полученного серотипа, или изолята, или клон AAV содержит по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR). Векторы по изобретению обычно содержат два ITR, предпочтительно по одному на каждом конце генома. Последовательность ITR действует *in cis* для предоставления функциональной точки начала репликации, и делает возможной интеграцию и вырезание вектор из генома клетки. Предпочтительные последовательности ITR представляют собой последовательности AAV2 и их варианты. Геном AAV обычно содержит упаковочные гены, такие как гены *гер* и/или *сар*, которые кодируют функциональные элементы упаковки для вирусной частицы AAV. Ген *гер* кодирует один или больше белков: Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40, или их варианты. Ген *сар* кодирует один или больше белков капсида, таких как: VP1, VP2 и VP3, или их варианты. Эти белки формируют капсид вирусной частицы AAV. Варианты капсида обсуждаются ниже.

Предпочтительно геном AAV будет дериватизирован с целью введения пациенту. Такая дериватизация является стандартной в данной области техники, и настоящее изобретение охватывает использование любой известной производной генома AAV, и производных, которые могут быть получены с применением методов, известных в данной области техники. Дериватизация генома AAV и капсида AAV рассмотрена, например, в Choi et al. и Wu et al., упомянутые выше.

Производные генома AAV включают любые усеченные или модифицированные формы генома AAV, которые делают возможной экспрессию *in vivo* трансгена Rep-1 из вектора по изобретению. Как правило, является возможным значительное усечение генома AAV с целью создать минимальную вирусную последовательность и при этом сохранить указанную выше функцию. По соображениям безопасности это является предпочтительным для того, чтобы снизить риск рекомбинации вектора с вирусом дикого типа, а также чтобы предотвратить индукцию клеточной иммунной реакции, что может возникнуть из-за присутствия в клетке-мишени белков вирусных генов.

Как правило, производное будет содержать по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), предпочтительно больше одного ITR, например, два ITR или больше. Один или больше ITR могут быть получены из геномов AAV, имеющих разные серотипы, или могут быть химерным или мутантным ITR. Предпочтительным мутантным ITR является тот, который имеет делецию *trs* (terminal resolution site - сайт терминального расщепления). Эта делеция позволяет продолжить репликацию генома для образования одноцепочечного генома, который содержит как кодирующую, так и комплементарную последовательность, т.е. самокомплементарный геном AAV. Это позволяет пропускать этап репликации ДНК в клетке-мишени и, таким образом, обеспечивает ускоренную экспрессию трансгена.

Один или несколько ITR предпочтительно будут фланкировать экспрессионную кассетную конструкцию, содержащую промотор и трансген по изобретению. Вставка одного или больше ITR является предпочтительной для способствования упаковке вектора по изобретению в вирусные частицы. В предпочтительных вариантах реализации изобретения, элементы ITR будут единственными сохраненными в производном последовательностями из природного генома AAV. Таким образом, производное предпочтительно не содержит гены *гер* и/или *сар* нативного генома, и любые другие последовательности нативного генома. Это является предпочтительным по причинам, описанным выше, а также для уменьшения возможности интеграции вектора в геном клетки-хозяина. Кроме того, уменьшение размера генома AAV позволяет повысить гибкость при вставке других элементов последовательности (таких как регуляторные элементы) внутрь вектора в дополнение к трансгену. Ссылаясь на геном AAV2, в производном по изобретению могут быть удалены следующие части: одна последовательность инвертированного терминального повтора (ITR), гены репликации (*гер*) и капсида (*сар*). Однако, в некоторых вариантах реализации изобретения, включая *in vitro* варианты реализации изобретения, производные могут дополнительно содержать один или несколько генов *гер* и/или *сар*, или другие вирусные последовательности генома AAV.

Производным может быть химерное, перетасованное или капсид-модифицированное производное одного или нескольких встречающихся в природе вирусов AAV. Изобретение охватывает размещение последовательностей белков капсида из разных серотипов, клад, клонов или изолятов AAV в пределах одного и того же вектора. Изобретение охватывает упаковку генома одного серотипа в капсид другого серотипа, т.е. псевдотипирование.

Химерные, перетасованные или капсид-модифицированные производные обычно выбирают для предоставления одной или больше желательных функциональных возможностей вирусному вектору. Таким образом, эти производные могут проявлять повышенную эффективность генной доставки, уменьшенную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный диапазон тропизма и/или улучшенное нацеливание на конкретный тип клеток по сравнению с вирусным вектором AAV, содержащим природный геном AAV, такой как геном AAV2. Повышенная эффективность генной доставки может быть достигнута за счет улучшенного связывания с рецептором или ко-рецептором на поверхности клетки, улучшения проникновения в клетку, улучшения передвижения внутри клетки и попадания в ядро, улучшения сбрасывания капсида вирусной частицы и улучшения превращения одноцепочечного генома

в двухцепочечную форму. Повышенная эффективность может также относиться к измененному диапазону тропизма или нацеливанию на конкретную популяцию клеток, так что доза вектора не разбавляется путем введения в ткани, где это не требуется.

Химерные капсидные белки включают те, которые продуцируются рекомбинацией между двумя или больше капсид-кодирующими последовательностями встречающихся в природе серотипов AAV. Это может быть выполнено, например, с помощью метода спасения генетического маркера, в котором неинфекционные капсидные последовательности одного серотипа были котрансфицированы капсидными последовательностями другого серотипа, и используют направленный отбор для выбора капсидных последовательностей, имеющих желаемые свойства. Капсидные последовательности различных серотипов могут быть изменены путем гомологичной рекомбинации внутри клетки для продуцирования новых химерных капсидных белков. Химерные капсидные белки также включают те, которые создаются путем конструирования последовательностей капсидных белков для переноса конкретных доменов, поверхностных петель или отдельных аминокислотных остатков капсидного белка между двумя или больше капсидными белками, например, между двумя или больше капсидными белками разных серотипов.

Перетасованные или химерные белки капсида также могут быть получены путем перетасовки ДНК, или с помощью вносящей ошибки ПЦР. Капсидные гибридные гены AAV могут быть созданы путем случайной фрагментации последовательностей родственных генов AAV, например, тех, которые кодируют белки капсидов, из множества различных серотипов, и затем последующей сборки фрагментов в полимеразной реакции с самоотжигом (selfpriming), что также может приводить к кросинговеру в областях гомологии последовательностей. Библиотека гибридных генов AAV, созданных таким образом, т.е. путем перетасовки капсидных генов нескольких серотипов, может быть скринирована для идентификации вирусных клонов, имеющих желаемую функциональность. Аналогично, может быть использована вносящая ошибки ПЦР для случайного мутирования капсидных генов AAV для создания разнородной библиотеки вариантов, которые затем могут быть выбраны по желаемому свойству.

Последовательности капсидных генов также могут быть генетически модифицированы для введения конкретных делеций, замен или вставок по отношению к последовательности нативного дикого типа. В частности, капсидные гены могут быть модифицированы путем вставки последовательности неродственного белка или пептида в открытую рамку считывания последовательности, кодирующей капсид, или на N- и/или C-конце последовательности, кодирующей капсид.

Неродственный белок или пептид может преимущественно быть тем, который действует как лиганд для конкретного типа клеток, тем самым обеспечивая улучшенное связывание с клеткой-мишенью, или улучшенную специфичность нацеливания вектора на конкретную популяцию клеток.

Неродственный белок также может быть тем, который способствует очистке вирусной частицы как части процесса производства, т.е. эпитопом или аффинной меткой. Место вставки, как правило, выбирают таким образом, чтобы не нарушить другие функции вирусной частицы, например, функцию проникновения в клетки, функцию перемещение вирусных частиц в клетке. Специалист в данной области техники может определить подходящие сайты для вставки на основе знаний известного уровня техники. Конкретные сайты описаны в Choi et al., упомянутом выше.

Изобретение дополнительно включает предоставление последовательностей генома AAV в другом порядке и конфигурации по сравнению с нативным геномом AAV. Изобретение также охватывает замену одной или больше последовательностей, или генов AAV, последовательностями из другого вируса или химерными генами, состоящими из последовательностей из более чем одного вируса. Такие химерные гены могут состоять из последовательностей из двух или более родственных вирусных белков разных вирусных видов.

Вектор по изобретению принимает форму вирусного вектора, содержащего промоторы и экспрессирующие конструкции по изобретению.

В изобретении также предложена вирусная частица AAV, содержащая вектор по изобретению. Частицы AAV по изобретению включают транскарпидированные формы, причем геном AAV или производное, имеющий(-щее) ITR одного серотипа, упаковывают в капсид другого серотипа. Частицы AAV по изобретению также включают мозаичные формы, причем смесь немодифицированных капсидных белков из двух или более различных серотипов составляет вирусную оболочку. Частица AAV также включает химически модифицированные формы, несущие лиганды, адсорбированные на поверхности капсида. Например, такие лиганды могут включать антитела для нацеливания на конкретный рецептор на поверхности клетки.

В изобретении дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая вектор или вирусную частицу AAV по изобретению.

Векторы по изобретению могут быть получены стандартными способами, известными в данной области техники для предоставления векторов для генной терапии. Таким образом, могут быть использованы общепринятые и общедоступные способы трансфекции, упаковки и очистки для приготовления подходящей формы вектора.

Как обсуждалось выше, вектор по изобретению может содержать полный геном встречающегося в природе вируса AAV в дополнение к промотору по изобретению или его варианту. Однако обычно ис-

пользуется дериватизированный геном, например, производное, которое имеет по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), но в которой могут отсутствовать любые гены AAV, такие как гер или сар.

В таких вариантах реализации изобретения для того, чтобы обеспечить сборку дериватизированного генома в вирусную частицу AAV, будут предложены дополнительные генетические конструкции, обеспечивающие функции AAV и/или вспомогательного вируса в клетке-хозяине, в комбинации с дериватизированным геномом. Эти дополнительные конструкции обычно содержат гены, кодирующие структурные белки капсида AAV, т.е. сар, VP1, VP2, VP3, и гены, кодирующие другие функциональные элементы, необходимые для жизненного цикла AAV, такие как гер. Выбор структурных белков капсида, предоставленных в дополнительной конструкции, будет определяться серотипом упакованного вирусного вектора.

Особенно предпочтительный упакованный вирусный вектор для использования в изобретении включает дериватизированный геном AAV2 в комбинации с капсидными белками AAV5 или AAV8. Как упоминалось выше, вирусы AAV являются неспособными к репликации и, следовательно, вспомогательные функции вируса, предпочтительно вспомогательные функции аденовируса, как правило, также предоставляются в одной или больше дополнительных конструкциях для того, чтобы обеспечить репликацию AAV.

Все вышеуказанные дополнительные конструкции могут быть предоставлены в виде плазмид или других эписомальных элементов в клетке-хозяине, или, альтернативно, одна или несколько конструкций могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина.

Фармацевтические композиции, дозировки и лечение.

Вектор по изобретению может быть приготовлен в виде фармацевтических композиций. В дополнение к вектору, эти композиции могут содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точный характер носителя или другого вещества может быть определен специалистом в соответствии с путем введения, то есть в данном документе: прямой ретинальной, субретинальной или интравитреальной инъекцией.

Фармацевтическая композиция обычно предоставляется в жидкой форме. Жидкие фармацевтические композиции в целом, как правило, включают: жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены: физиологический солевой раствор, хлорид магния, декстроза или другой раствор сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях может быть использовано поверхностно-активное вещество, такое как 0,001% плурониковая кислота (PF68).

Для инъекции в место повреждения, активный ингредиент будет представлен в форме водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет подходящие: pH, изотоничность и стабильность. Специалистам в данной области техники хорошо удастся приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактозой для инъекций, раствор Хартмана. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Для замедленного высвобождения, вектор может быть включен в фармацевтическую композицию, которая составлена для медленного высвобождения, например, в микрокапсулы, сформированные из биосовместимых полимеров, или в липосомальные системы-носители, в соответствии со способами, известными в данной области техники. Векторы и/или фармацевтические композиции по изобретению могут быть упакованы в набор.

В целом, как правило, предпочтительной является прямая ретинальная, субретинальная или интравитреальная доставка векторов по изобретению, как правило, путем инъекции. Таким образом, предпочтительной является доставка в сетчатку, субретинальное пространство или интравитреальное пространство. Векторы могут также вводиться в фоторецепторы-палочки *in vitro* с последующей трансплантацией клеток в сетчатку.

Векторы и/или фармацевтические композиции по изобретению могут также использоваться в сочетании с любой другой терапией для лечения или профилактики нарушений зрения. Например, они могут использоваться в комбинации с известными способами лечения, в которых используются антагонисты VEGF, например, анти-VEGF антитела, такие как бевацизумаб, или ранибизумаб, или антагонисты растворимых рецепторов, такие как афлибицепт, для лечения ВДЖП или других глазных патологий, как описано в данном документе.

Дозы и схемы приема лекарств могут быть определены в пределах обычного навыка врача, ответственного за введение композиции. Доза вектора по изобретению может быть определена в соответствии с различными параметрами, особенно согласно информации об возрасте, весе и состоянии пациента, подлежащего лечению; пути введения; и требуемой схеме приема лекарств. Опять же, врач сможет определить необходимый путь введения и дозировку для любого конкретного пациента.

Типичная разовая доза составляет от 10^{10} до 10^{12} геномных частиц в зависимости от количества

ткани сетчатки, которая требует трансдукции. Геномная частица определяется в данном документе как капсид AAV, который содержит одноцепочечную молекулу ДНК, которая может быть количественно определена с помощью специфичного для последовательности способа (такого как ПЦР в реальном времени). Эта доза может быть предоставлена в виде разовой дозы, но может быть дублирована для другого глаза, или для тех случаев, когда вектор может не попадать в правильную область сетчатки по любой причине (например, из-за хирургического осложнения). Лечение предпочтительно является однократным долговременным лечением для каждого глаза, но могут быть рассмотрены повторные инъекции, например, в последующие годы и/или с различными серотипами AAV.

Лечение.

Векторы по изобретению могут использоваться для лечения любой глазной патологии, при которой возникает дисфункция, дегенерация или отсутствие колбочек, но по меньшей мере остаются некоторые здоровые палочки. Функция колбочек может быть полностью или частично утрачена, например, может быть утрачено по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или больше. Здоровые палочки представляют собой палочки, которые способны функционировать полностью или частично, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 90% от нормальной функции палочек с точки зрения восприятия света на скотопических уровнях.

Патологии, которые можно лечить с применением векторов по изобретению, включают, таким образом, дегенерацию желтого пятна, ахроматопсию и амавроз Лебера. Дегенерация желтого пятна может быть возрастной дегенерацией желтого пятна (ВДЖП), например, влажной или неоваскулярной ВДЖП, или географической атрофией, наследственной дегенерацией желтого пятна, или наследственной дегенерацией колбочек. В некоторых вариантах реализации изобретения, изобретение приведет к созданию "псевдо-центральной ямки", небольшого участка колбочко-подобных палочек, который улучшает зрение в условиях, когда колбочки центральной ямки были утрачены или являются дисфункциональными.

В целом, как правило, пациенты, которых будут лечить векторами по изобретению, будут представлять собой пациентов-людей. Они могут быть мужчинами или женщинами, и любого возраста.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Примеры

Пример 1 - способы для экспериментов ArchT.

Животные.

Мыши дикого типа (C57BL/6J) были приобретены в Harlan Laboratories (Блэкторн, Великобритания). Мышей CNGA3^{-/-} и PDE6C^{-/-} разводили в лаборатории. Всех мышей поддерживали в условиях периодического освещения (12 ч свет-тьма); освещение в клетке составляло 7 фут-кандел в течение светового цикла. Все эксперименты были одобрены местными комитетами по уходу и использованию животных (УКЛ, Лондон, Великобритания), и соответствовали руководствам по уходу и использованию животных, принятым Обществом неврологии и Ассоциацией исследования зрения и офтальмологии (Роквилл, Мэриленд).

Плазмидные конструкции, производство вирусов и процедуры инъекции.

Трансгенная конструкция (ArchT-EGFP) была любезно предоставлена профессором Ед Бойден (МТИ, США), и содержит кДНК-последовательность гена ArchT, слитого с флуоресцентным белком EGFP. Плазмиды упаковывали в AAV8 для получения рекомбинантных вирусных векторов AAV-AAV8.hRho.ArchT-EGFP. Рекомбинантный вектор AAV8 продуцировали с помощью способа тройной временной трансфекции, как описано ранее. Плазмидную конструкцию, AAV-серотип-специфичную упаковочную плазмиду и вспомогательную плазмиду смешивали с полиэтиленимином (Polysciences Inc.) для формирования комплексов трансфекции, которые затем добавляли к 293T-клеткам и оставляли на 72 ч. Клетки собирали, концентрировали и лизировали, чтобы высвободить вектор. AAV8 очищали с использованием колонок Sepharose AVB (GE Healthcare). Оба промывали в однократном ФСБ (фосфатно-солевом буфере) и концентрировали до объема 100-150 мкл. Титры вирусных частиц определяли с помощью сравнительной дот-блот гибридизации ДНК, приготовленной из очищенных вирусных стоков и установленных плазмидных контролей. Очищенные векторные концентраты, которые применяли во всех экспериментах, имели 5×10^{12} вирусных частиц/мл. Субретиальные инъекции выполняли, как описано ранее нашей группой, и они состояли из двойных инъекций по 2 мкл каждая.

Иммуногистохимия.

Животные были подвергнуты эвтаназии, были выданы глазные яблоки и удалены роговица, хрусталик и радужка. Для получения срезов сетчатки, глазные чаши фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФД) в течение 1 ч при комнатной температуре, перед внесением в среду оптимальной температуры нарезки (ОСТ - optimal cutting temperature). 30 мкм криосрезы нарезали в сагиттальной ориентации, промывали ФСБ и блокировали в 10% нормальной сыворотке козла (НСК), 3% бычьим сывороточным альбумином (БСА) и 0,1% Triton-X100. Соответствующие образцы инкубировали с первичными антителами в блокирующем растворе при 4°C в течение ночи с использованием кроличьего анти-колбочкового аррестина (разведенного 1:500). После промывки ФСБ применяли соответствующую комбинацию вторичных антител (все разведенные 1:500, life technologies), включая козел-анти-кролик Alexa Fluor 546 (каталож-

ный номер A11035), козел-анти-мышь Alexa Fluor 633 (каталожный номер A21052) и стрептавидин, конъюгат Alexa Fluor 633 (каталожный номер S21375) для мечения образцов перед тем, как они были докрашены (после обесцвечивания) DAPI и закреплены с помощью закрепляющей флуоресценцию среды DAKO (DAKO, S3023, Дания). Изображения были получены с помощью конфокальной микроскопии (Leica DM5500Q).

Регистрация сигнала одиночного фоторецептора с помощью присасывающего электрода-пипетки.

Животные были адаптированы к темноте в течение 12 ч до начала экспериментов. Мышам вводили избыточную дозу анестезирующей смеси кетамин-дормитор через внутривентриальную полость, чтобы вызвать терминальную хирургическую плоскостную анестезию. Затем мышей умерщвляли смещением шейных позвонков и им выдаляли глазные яблоки. Глаза были рассечены при тусклом дальнем красном свете. Выделенные сетчатки помещали в 1% раствор агарозы с низкой точкой плавления, а затем нарезали с использованием вибротома (Leica) на лицевые срезы толщиной 230 мкм. Срезы были закреплены в записывающей камере и перфузированы средой Эймса, насыщенной карбоновой кислотой (95% O_2 5% CO_2), содержащей 100 мкМ 9-цис ретиналя (Sigma) и 0,2% БСА (Sigma). Температуру перфузионного раствора поддерживали равной 37°C с использованием встроенного нагревательного элемента под контролем обратной связи (Scientifica). Пэтч-пипетки с малым сопротивлением (1-2 МОм) были изготовлены из нитевидных боросиликатных стеклянных капилляров (Harvard Apparatus Ltd) с использованием вертикального пуллера (puller) Narishige PC-10. Пипетки были заполнены наружным раствором, размещены на хедстейдже (headstage), и прилагали небольшое давление к наконечнику (~30 мбар). Используя инфракрасное освещение и микроскоп для визуализации, пипетка была помещена на поверхность сетчатки, а затем погружалась на примерно 50 мкм в срез до тех пор, пока сегменты фоторецептора не оказывались неповрежденными и аккуратно расположенными. Небольшое отрицательное давление было применено к наконечнику пипетки, во время того как он медленно продвигался по ткани сетчатки, используя импульс 100 мс, 10 мВ для контроля сопротивления по всему наконечнику пипетки. Когда сопротивление увеличилось до ~20-30 МОм, были вызваны светочувствительные ответные реакции. Световые стимулы от светодиодного источника света (пиковая длина волны 530 нм), соединенного с световодом на основе жидкости (liquid light guide), были поданы через объектив микроскопа (Olympus). Применяли нейтральные светофильтры для точного управления интенсивностью светового стимула. Световые стимулы состояли из прямоугольных волновых импульсов, запрограммированных с использованием программного обеспечения P-Clamp (Molecular Devices), и доставлялись через плату DAC (Axon Instruments) в соединении с светодиодным драйвером (Thorlabs).

Электрофизиологическое записывание данных проводили с использованием усилителя Multiclamp 700B (Molecular Devices). Данные оцифровывались с частотой 20 кГц.

ЧМЭ регистрация сигналов.

Животные были адаптированы к темноте в течение 12 ч до начала экспериментов. Мышам вводили избыточную дозу анестезирующей смеси кетамин-дормитор через внутривентриальную полость, чтобы вызвать терминальную хирургическую плоскостную анестезию. Затем мышей умерщвляли смещением шейных позвонков и им выдаляли глазные яблоки. Глаза вскрывали в насыщенной карбогеном (95% кислорода, 5% углекислого газа) среде Эймса (Sigma), под тусклым красным светом. Роговица и хрусталик были удалены, при этом были приложены усилия, чтобы удалить как можно больше стекловидного тела с поверхности сетчатки. ПЭС отделяли от сетчатки, и плоский сегмент (petal) размером 1-3 мм отрезали от "чашки" сетчатки. Этот ретинальный сегмент помещали стороной на которой находятся ганглионарные клетки на поверхность мультиэлектродного чипа, а для удерживания сегмента в нужном положении применяли кружок с ручкой, сделанный из инертной платиновой проволоки (Sigma) и нейлона. Во всех записях сигнала ткань перфузировали насыщенной карбогеном средой Эймса (Sigma), поддерживаемой при температуре 36,5°C. Для записей, которые включали скотопические или мезопические условия, перфузионную среду готовили так, чтобы она содержала 9-цис-ретиналь (Sigma) в концентрации 100 мкМ в 0,2% БСА (Sigma). Для записи внеклеточных потенциалов ганглионарных клеток был использован перфорированный записывающий чип с 60 электродами, состоящий из вольфрамовых электродов, расположенных на расстоянии 100 мкм друг от друга (Multi Channel Systems). Изменения напряжения были усилены и оцифрованы на частоте 50 кГц системой MC Card, используя программное обеспечение MC Rack (Multichannel Systems).

Анализ электрофизиологических данных.

Электрофизиологические данные были проанализированы с использованием пользовательских макросов в IgorPro 6. Синаптические токи и потенциалы были обнаружены с использованием алгоритма амплитудного порога, причем порог для обнаружения события был установлен как величина в два раза превышающая стандартное отклонение базового шума (обычно около 10 пА). Обнаруженные токи и потенциалы подтверждали вручную путем тщательной проверки всех электрофизиологических данных.

Выработка условных рефлексов страхом (Fear conditioning).

Мишей обучали и тестировали с использованием коммерчески доступной системы выработки условных рефлексов страхом (Med Associates). Чтобы обеспечить условия слепого эксперимента, экспериментатор, выполняющий подготовку и тестирование, всегда был не осведомлен о штамме мышей и усло-

виях лечения. Вкратце, установка состояла из камеры для выработки условных рефлексов (20×30 см) с полом-решеткой из нержавеющей стали, размещенной внутри небольшой звукоизолированной комнатки. Поведение мыши постоянно контролировалось во время обучения и тестирования с помощью встроенной инфракрасной цифровой видеокамеры (скорость приема 30 кадров/с) и инфракрасного освещения. Программное обеспечение Video Freeze (Med Associates) использовалось для контроля доставки световых стимулов и электрических ударов. Световой стимул состоял из одной светодиодной (530 нм, Thorlabs) 5 Гц 50 мс вспышки с полной яркостью, генерируемой через интерфейс Arduino (программное обеспечение Arduino); лампа была расположена на боковой панели камеры для выработки условных рефлексов. Для обеспечения того, чтобы условия, в котором проходили обучение и тестирование отличались, панель пола и искривлённые панели стен были вставлены в камеру для сеанса тестирования. Фоновый белый свет использовался для уменьшения вероятности активации палочек, а зрачки были расширены каплями тропикамида, чтобы увеличить количество света, достигающего сетчатки мыши.

Мышей помещали внутрь камеры и проводили одну сессию выработки условных рефлексов, состоящую из 6 парных 5-секундных световых стимулов, совмещенных с 2-секундным ударом электричества 0,65 мА. Интервал между стимулами был псевдо-рандомизированным (средний интервал 90 с). После тренировки мышей возвращали в домашнюю клетку. Через 24 ч после тренировки мышей тестировали на вспоминание по визуальным ориентирам. Мышей помещали в испытательную камеру и наблюдали за ними в течение 360 с. Световой стимул выработки условного рефлекса подавали непрерывно в течение последних 120 с тестового сеанса. Все данные были автоматически получены и оценены с помощью программного обеспечения VideoFreeze (Med Associates). Вкратце, программное обеспечение калибрует перед размещением животного в камере. Затем программное обеспечение измеряет изменения пикселей, которые происходят между каждым видеокадром. Порог движения был установлен как можно ниже (20 единиц индекса движения), а непрерывный подсчет замираний был приравнен к частоте кадров, чтобы обеспечить наиболее чувствительное считывание движения. Для оценки вспоминания с помощью световых сигналов процентное время замирания было усреднено в течение 2 мин непосредственно перед началом запуска подачи светового стимула и после него.

Статистическая значимость оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (COC).

Оптомоторное исследование.

Остроту зрения измеряли, наблюдая оптомоторные ответы мышей на вращающиеся синусоидальные решетки (OptoMotry, Cerebral Mechanics). Используемый протокол дает на выходе независимые измерения остроты правого и левого глаза, исходя из неравной чувствительности двух глаз к вращению рисунка, поскольку только движение в направлении от виска к носу вызывает реакцию слежения. В результате правый и левый глаза наиболее чувствительны к вращению против часовой стрелки (ПЧС) и по часовой стрелке (ЧС) соответственно. Стимулы различной временной частоты использовались для определения порога, при котором присутствовал отклик. Была применена двойная слепая двухвариантная принудительная процедура выбора, в которой наблюдатель был "слеп" в направлении поворота рисунка, будь то прошедшая лечение или не прошедшая лечение ArchT мышь CNGA3-/- или PDE6C-/-, или совпадающее по возрасту контрольное животное дикого типа (C57BL6). Остроту зрения измеряли для обоих глаз испытуемого животного и усредняли, или отдельно анализировали для каждого глаза после того, как были проведены 4 испытания в течение 4 отдельных дней. Измерение проводили на инъектированных мышках через 3-10 недель после лечения этих мышей вместе с контрольными изогенными совпадающими по возрасту мышками.

Пример 2. Экспрессия ArchT в фоторецепторах-палочках дает возможность реагировать с помощью быстрых ответных реакций без "обесцвечивания".

Обеспечиваемое палочками зрение оптимизировано к низким уровням освещенности, включая одnofотонное детектирование. Однако палочки не могут сравниться с колбочками по скорости запуска и восстановления реакций реагирования на свет (Fu et al., 2007, Pugh et al., 1999). Это функциональное различие, полезное для обеспечения надежного зрения в разных средах, становится истощающим, когда опосредованное колбочками зрение утрачивается при таких патологиях, как возрастная дистрофия жёлтого пятна, когда плотно упакованные колбочки в центральной ямке подвергаются деградации (de Jong 2006). Было исследовано, могут ли палочки реагировать и восстанавливаться более быстро в ответ на стимулы; это может помочь смягчить функциональные нарушения, вызванные потерей колбочек.

Быстрый свето-управляемый протонный насос (ArchT) (Han et al., 2011) был экспрессирован в фоторецепторах-палочках. Частицы AAV8, несущие ArchT-EGFP под контролем промотора родопсина (Rho), вводили субретинально взрослым мышам. Экспрессия Rho-ArchT-EGFP ограничивалась мембраной фоторецепторов-палочек (фиг. 1А-Б). Синаптические концы палочек, экспрессирующие Rho-ArchT-EGFP, и колбочек, можно легко отличить после иммуногистохимии (фиг. 1В). Количественная ПЦР на сортированной популяции колбочек подтвердила, что экспрессия Rho-ArchT-EGFP была специфичной для популяции палочек, и никаких явных признаков токсичности не наблюдалось к 6 месяцу после инъекции AAV8. Экспрессия ArchT делала возможными чрезвычайно быстрые реакции реагирования на

свет, в то время как собственная реакция палочек сохранялась и была сопоставима с наблюдаемой в не-трансдуцированных фоторецепторах-палочках (фиг. 1Г). Вызванные светом токи, записанные с палочек, экспрессирующих ArchT, демонстрировали значительно более быструю кинетику, чем собственные токи палочек во всех тестируемых мышинных моделях (фиг. 2А-В). Эта кинетика позволила вызванным светом токам быть усиленными вплоть до 80 Гц, что намного превышает пределы как палочек, которые замирают при -20 Гц (фиг. 2А-В), так и колбочек (Fu et al., 2007).

Удивительно, что экспрессия ArchT не изменяла характеристик фоторецепторов-палочек, но кроме того она предоставляла дополнительную способность реагировать путем быстрых ответов без обесцвечивания (фиг. 2Д).

Пример 3 - экспрессирующие ArchT палочки запускали устойчивую генерацию импульсов ГКС при высоких интенсивностях освещения и на частотах, приближающихся к частотам фоторецепторов-колбочек.

Затем было исследовано, сможет ли запускаемый палочками нейронный путь успевать за зрительным восприятием, обеспечиваемым более быстрыми, чем нормальные, палочками. Пути палочек и колбочек имеют некоторые схожести, и некоторые значительные различия, и поэтому неясно, могут ли нейронные пути палочек надежно выдерживать быструю "колбочко-подобную" передачу (Wassle et al., 2004). Было показано, что палочки напрямую контактируют с OFF-биполярными клетками колбочек (деполяризация в этих клетках обуславливается исходящим катионным током) (Soucy et al., 1998 and Hack et al., 1999) и стимуляция парной вспышкой предполагает, что этот альтернативный путь может быть столь же быстрым, как и путь колбочка-OFF-биполярная клетка (Li et al., 2010). Однако неясно, насколько устойчивым может быть этот ответ, и могут ли ON-биполярные клетки палочек также поддерживать быструю передачу. Кроме того, синаптические концы палочек имеют отличающийся размер и ультраструктурную организацию по сравнению с колбочками, и биполярные клетки палочек не контактируют напрямую с ганглионарными клетками сетчатки (ГКС), а только через путь, включающий АП амакриновые клетки (Wässle et al., 2004). Чтобы исследовать максимальную скорость, которой может достичь путь передачи сигналов палочек, было выполнено мультиэлектродное записывание сигналов, получаемых от ГКС в мышинных моделях, имеющих нефункционирующие колбочки, чтобы определить исходящий сигнал ГКС, опосредуемый палочками. Создаваемые палочками ответные реакции в ГКС в не трансдуцированных сетчатках "обесцвечивались" при высоких уровнях освещенности и не могли следовать частотам стимуляции выше чем -20 Гц (фиг. 2Е).

Напротив, экспрессирующие ArchT палочки вызывали генерацию импульсов ГКС при высоких интенсивностях света и на частотах, приближающихся к частотам фоторецепторов-колбочек (фиг. 2Е).

Пример 4 - экспрессия Rho-ArchT-EGFP расширила чувствительность мышей, утративших опосредованное колбочками зрение, к ярким световым стимулам.

Чтобы это более быстрое, чем нормальное, зрительное восприятие, обеспечиваемое палочками, было полезным, было подмечено, что мыши должны иметь возможность использовать опосредованные ArchT токи для надежного реагирования на яркие и быстрые стимулы. Мыши CNGA3^{-/-} и PDE6C^{-/-}, у которых отсутствовало опосредованное колбочками зрение (Biel et al., 1999 and Change et al., 2009), не смогли обучаться через выработку условных рефлексов страхом, когда яркие световые раздражители следовали в паре с и прекращались вместе с легким ударом тока по ногам (фиг. 3А). Однако экспрессия Rho-ArchT-EGFP расширила чувствительность этих мышей к ярким световым стимулам, позволяя происходить обучению, основанному на связи между зрительным стимулом и ударом тока (фиг. 3А). Наконец, была протестирована возможность того, может ли экспрессия ArchT обеспечивать быстрое зрительное восприятие мышам CNGA3^{-/-} и PDE6C^{-/-}. Оценивание быстроты зрительного восприятия с помощью оптомоторного тестирования (Umino et al., 2008) показало, что мыши, экспрессирующие ArchT, были способны отслеживать стимулы быстрее, чем мыши, которым не делали субретинальные вирусные инъекции, и чем мыши, которые получали вектор, содержащий только GFP (фиг. 3Б). Максимальная частота стимулов, которую могли отслеживать мыши, экспрессирующие ArchT, была схожей с той же у фоторецепторов-колбочек (фиг. 3Б).

Вместе эти результаты показывают, что палочки могут возбуждаться быстрее, чем их собственным каскадом фототрансдукции, и что нейронные пути, запускаемые палочками, могут поддерживать более быструю сигнализацию. Важно отметить, что синаптическое высвобождение из палочек не требует больших колебаний напряжения, но небольшие токи могут вместо этого вызывать достаточные колебания напряжения, чтобы значительно изменить их синаптическую передачу (Cangiano et al., 2012). Это расширяет применение изобретения при уровнях освещенности, которые в несколько раз ниже средних уровней освещенности, необходимых для оптогенетического управления активностью в большинстве других нейронов (Han et al., 2011).

Пример 5 - способы для экспериментов RPAP.

Животные.

Мышей C57BL6 (Harlan, Великобритания), Cnga3^{-/-} (J.R. Heckenlively, Мичиганский университет), Pde6c^{-/-} (J.R. Heckenlively, Мичиганский университет, Мичиган) (Chang et al., 2009) и Gnat1^{-/-} (J. Lem, Университетская школа медицины Тафтса, Массачусетс) (Calvert et al., 2000) содержали в виварии в

Университетском колледже Лондона. Взрослые животные мужского и женского пола имели возраст 6-12 недель во время инъекции вируса, и они использовались для экспериментов по меньшей мере через 2 недели после инъекции, чтобы обеспечить достаточную экспрессию R9AP. Все используемые мыши имели возраст от 2 до 6 месяцев и, совпадали по возрасту между группами данного эксперимента. Все эксперименты проводились в соответствии с политикой по использованию животных и людей в нейробиологических исследованиях и в соответствии с спецификацией АИЗО (Ассоциация исследования зрения и офтальмологии) об использовании животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения. Животных содержали при стандартном 12/12-часовом цикле день-ночь.

Плазмидные конструкции и получение рекомбинантного AAV8.

кДНК R9ap мыши была амплифицирована с помощью ПНР из кДНК сетчатки мыши с использованием праймеров, которые были разработаны для охвата всей кодирующей области. кДНК R9ap клонировали в вектор между промотором (промотор ЦМВ (цитомегаловирус) или промотор родопсина быка) и сайтом полиаденилирования SV40. Эти плазмиды использовали для создания двух псевдотипированных вирусных векторов AAV2/8 - гAAV2/8.CMV.mR9ap и гAAV2/8.Rho.mR9ap, как описано ниже.

Рекомбинантный вектор AAV2/8 продуцировали способом тройной временной трансфекции, как описано ранее (Gao et al., 2002). Плазмидная конструкция, AAV серотип-специфическая упаковочная плаزمид и вспомогательная плазмид были смешаны с полиэтиленимином для формирования комплексов трансфекции, которые затем добавляли к клеткам 293T и оставляли на 72 ч. Клетки собирали, концентрировали и лизировали, чтобы выделить вектор. AAV2/8 очищали с помощью аффинной хроматографии и концентрировали с использованием ультрафильтрационных колонок (Sartorius Stedim Biotech, Геттинген, Германия), промывали в ФСБ и концентрировали до объема 100-150 мкл. Титры вирусных частиц определяли с помощью дот-блот гибридизации или ПЦР в реальном времени. Используемая концентрация очищенных векторов составляла $1-2 \times 10^{12}$ вирусных частиц/мл.

Электроретинограмма (ЭРГ).

ЭРГ записывали для обоих глаз после того, как мыши были адаптированы к темноте в течение ночи, используя коммерчески доступную систему (Espion E2, Diagnosys LLC, Лоуэлл, Массачусетс). Перед записью животных анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 0,007 мл/г смеси медетомидина гидрохлорида (1 мг/мл), кетамина (100 мг/мл) и воды в соотношении 5:3:42. Зрачки расширяли полностью с использованием 2,5% фенилэфрина и 1,0% тропикамида. Сначала были размещены субдермальные заземляющие электроды средней линии и референсные электроды рта, а затем серебряные плюс-электроды, которым разрешали слегка касаться центра роговицы под тусклым красным освещением. Каплю жидкого геля Viscotears 0,2% (Dr. Robert Winzer Pharma/OPD Laboratories, Уотфорд, Великобритания) помещали на плюс-электроды для того, чтобы сохранить роговицу увлажненной во время записи, и мышам позволяли проходить дальнейшую адаптацию к темноте в течение 5 мин. Частоты отсечения полосно-пропускающего фильтра составляли 0,312 Гц и 1000 Гц. Скорость восстановления фотоотклика измерялась с использованием концепции парной вспышки, в которой пары вспышек с одинаковой интенсивностью насыщения ($1,8 \log \text{ кд с/м}^2$), разделяли различными интервалами между стимулами (ИМС; 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 с). В этой концепции 1-я вспышка полностью подавляет электрические ответные реакции механизмов палочек, что позволяет наблюдать скорость функционального восстановления функции палочек, подавая 2-ю вспышку с различным ИМС. Предоставлялось достаточное количество времени (150 с) между парами вспышек, чтобы обеспечить полное восстановление после первой вспышки. Тогда наблюдаемое восстановление амплитуды а-волны должно отражать скорость деактивации палочек у животных, лишенных функции колбочек, поскольку вспышка должна только "обесцвечивать" часть (0,02%) родопсина (Lyubarsky et al., 2004 and Weymouth, A.E. & Vingrys 2008). Была выполнена серия 6 Гц вспышек с скопомической интенсивностью, как сообщалось ранее, с несколькими модификациями (Seeliger et al., 2001). Применяли 17 ступеней интенсивности вспышки от -6 до $2 \log \text{ кд с/м}^2$, отделенные на 0,5 $\log$ единиц друг от друга. Для каждой ступени, после 10 секунд адаптации, 600 мс свипы ("sweeps") усреднялись 20 раз, используя одно и то же условие вспышки. Также была получена серия адаптированных к темноте ответных реакций с использованием более длительных вспышек с длительностью 20, 100 и 200 мс при $83,3 \text{ кд/м}^2$. Стандартные одновспышковые скопомические записи были получены на адаптированных к темноте животных при следующих возрастающих интенсивностях света: -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 0, 1,5 и 1,9 $\log \text{ кд с/м}^2$. Записи в ответ на фотопические вспышки выполнялись с 5 минутными интервалами световой адаптации при интенсивности фонового света 20 кд/м^2 , который также использовался в качестве фонового освещения в течение записи. Использовались такие фотопические интенсивности освещения: -2, -1, 0, 1, 1,5 и 1,9 $\log \text{ кд с/м}^2$.

Гистология.

Быстро выдаляли и замораживали в жидком азоте оба глаза из мыши Cnga3^{-/-} через шесть недель после односторонней субретинальной инъекции гAAV2/8.Rho.mR9ap. После криообработки глаза в среде OCT (RA Lamb, Истборн, Великобритания), глаза были порезаны на поперечные срезы толщиной 15 мкм, и высушены на воздухе в течение 15-30 мин. Для иммуногистохимии срезы предварительно блокировали в ФСБ, содержащем нормальную сыворотку осла (2%) и бычий сывороточный альбумин (2%), за 1 ч до инкубации с анти-RGS9-антителом (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Санта Круз, Калифорния) в

течение 2 ч при комнатной температуре. После полоскания в ФСБ 2 раза по 15 мин, срезы инкубировали с соответствующим вторичным меченным антителом Alexa 546 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) в течение 2 ч при комнатной температуре (КТ), промывали и докрашивали Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Джиллингем, Великобритания). Срезы сетчатки просматривали на конфокальном микроскопе (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Вецлара, Германия).

Вестерн-блоттинг.

Были изъятые глаза у мыши Cnga3^{-/-} через 4 недели после односторонней субретинальной инъекции rAAV2/8.Rho.mR9ap. После отделения нейрональной части сетчатки от комплекса ПЭС/сосудистая оболочка/склера, ткани гомогенизировали в буфере RIPA и оставляли на льду в течение 20 мин. Образцы центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин при 4°C и хранили при -20°C до использования. Вестерн-блоттинг проводили с использованием известных протоколов.

Оптомоторные ответные реакции и функция контрастной чувствительности.

Контрастные чувствительности и остроту зрения прошедших и непрошедших лечение глаз измеряли, наблюдая оптомоторные ответные реакции мышей на вращающиеся синусоидальные решетки (OrtoMetry™, Cerebral Mechanics, Летбридж, Альберта, Канада). Используемый протокол дает на выходе независимые измерения остроты правого и левого глаза исходя из неравной чувствительности двух глаз к вращению рисунка: правый и левый глаз приводятся в действие главным образом вращениями против часовой и по часовой стрелке соответственно (Douglas et al., 2005). Мышь была помещена на маленький островок, изолированный от пола, в замкнутое пространство, окруженное четырьмя мониторами с вращающейся синусоидальной решеткой, со средней освещенностью 62 кд/м². Была применена двойная слепая двухвариантная принудительная процедура выбора, в которой наблюдатель был "слеп" в направлении поворота рисунка, будь то прошедшая или непрошедшая лечение мышь Cnga3^{-/-}, или совпадающее по возрасту контрольное животное дикого типа (C57BL6). Чувствительность к контрастности, измеренная при 0,128, 0,256, 0,383, 0,511 циклов/градус, показанные при 6 Гц, была определена как 100, деленная на самый низкий процентный контраст, давая пороговую ответную реакцию. Оба глаза каждой мыши тестировались четыре раза в независимые дни. Данные были проецированы на диаграмму чувствительности контрастности Кэмпбелла-Робсона с помощью синусоидальных решеток, отображающих относительные пространственные частоты.

Измерение родопсина.

После полной темновой адаптации мышей в течение ночи, мышей анестезировали и зрачки полностью расширяли для оценки скорости зрительного "обесцвечивания" пигмента. Затем мышей помещали в световую коробку, с источником света (7,0 мВт) прямо освещающим глаз в течение 5 мин до того, как глаза были изъятые. В другом эксперименте мышей подвергали воздействию идентичных условий, таких же что и для измерения контрастной чувствительности, в течение различных периодов времени (0, 30, 60, 120 мин). Глаза мышей выдаляли в каждый момент времени и помещали в 250 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора, и замораживали в жидком азоте в непроницаемой для света трубке, и хранили при -20°C до использования. Некоторые глаза изымали в темноте под красным освещением после темновой адаптации мышей в течение ночи. Спектрофотометрическое измерение родопсина проводили, как сообщалось ранее с небольшими изменениями (Douglas et al., 1995). Вкратце, образцы оттаивали при комнатной температуре и гомогенизировали. Эта и все последующие операции выполнялись при тусклом красном освещении, которое минимально "обесцвечивало" зрительные пигменты. К каждому образцу добавляли 50 мкл н-додецил-β-D-мальтозида (200 mM, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), и полученную смесь вращали в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим 10-минутным центрифугированием (23000 g) при 4°C. Супернатант удаляли и помещали в кварцевую кювету в спектрофотометр Shimadzu UV-2101PC (Shimadzu, Киото, Япония). После первоначального сканирования "необесцвеченного" экстракта в диапазоне от 300 до 700 нм, образец освещали монохроматическим светом (502 нм) в течение 3 мин, чего, как уже было показано, достаточно для полного "обесцвечивания" родопсина (Longbottom et al., 2009), и проводили повторное сканирование. Все спектры поглощения были обнулены при 700 нм. Разностный спектр были построен с использованием кривых, полученных до и после "обесцвечивания", и были определены максимальные оптические плотности при примерно 500 нм, представляющие количество выделенного зрительного пигмента.

Пример 6 - избыточная экспрессия R9AP в палочках и повышенная скорость деактивации фоторецептора.

RGS9, Gβ5 и R9AP являются обязательными членами ГТФазного комплекса регуляции. Для изучения влияния AAV-опосредованной избыточной экспрессии R9AP на ГТФазный комплекс в палочках, исследовали количество и распределение RGS9 после субретинальной инъекции rAAV2/8.Rho.mR9ap у мышей Cnga3^{-/-}. Эти мыши имеют нормально функционирующие палочки, но нефункционирующие колбочки, и служат моделью ахроматопсии. Через четыре недели, прошедшая лечение сетчатка проявляла повышенную иммунореактивность против RGS9 по всему фоторецепторному слою в прошедших лечение сетчатках, по сравнению с непрошедшими лечение сетчатками (фиг. 4A). Анализ с помощью Вестерн-блоттинга дополнительно подтвердил повышенную экспрессию белка RGS9 в прошедшей лечение

сетчатке (фиг. 4Б). Эти результаты показали, что избыточная экспрессия R9AP с использованием AAV2/8 эффективно увеличивает уровень каталитического компонента RGS9 и ГТФазного комплекса.

Затем был изучен функциональный эффект AAV2/8-опосредованной избыточной экспрессии R9AP на фототрансдукцию палочек, применяя ЭРГ с парной вспышкой. (Lyubarsky and Pugh 1996). В этой концепции пара вспышек одинаковой интенсивности подавалась с переменным интервалом между стимулами и измерялось восстановление второй ответной реакции относительно первой. В пути фоторецептора-палочки, скорость восстановления а-волны (происходящей из фоторецепторов) зависит от скорости деактивации. Было обнаружено, что постоянная времени (σ) для 50% восстановления амплитуды а-волны была уменьшена на примерно 60% в глазах *Cnga3*^{-/-}, инъектированных гAAV2/8.CMV.mR9ap ($\sigma = \sim 2,99$ с) по сравнению с непрошедшими лечение глазами ($\sigma = \sim 7,38$ с; фиг. 4В). Аналогично, увеличенная скорость восстановления а-волны наблюдалась при использовании промотора родопсина (гAAV2/8.Rho.mR9ap; $\sigma = \sim 2,74$ с; фиг. 4В) в той же линии мышей (*Cnga3*^{-/-}), или того же вируса (гAAV2/8.CMV.mR9ap) в другой линии мышей с дефективными колбочками (*Pde6c*^{-/-}; фиг. 8). Эти наблюдения показали, что субретинальная инъекция гAAV2/8.CMV.mR9ap или гAAV2/8.Rho.mR9ap может значительно увеличить скорость деактивации фототрансдукции палочек за счет увеличения количества RGS9 и ГТФазного комплекса.

Пример 7 - "фотопический сдвиг" функции палочек посредством избыточной экспрессии R9AP.

Чтобы исследовать, может ли увеличенная скорость деактивации, достигнутая избыточной экспрессией R9AP и ГТФазного комплекса в палочках, изменить рабочий диапазон функции фоторецептора, записывали ЭРГ с 6 Гц вспышкой с адаптацией в темноте, используя постепенно возрастающие интенсивности вспышек. Глаза, подвергавшиеся лечению гAAV2/8.CMV.mR9ap или гAAV2/8.Rho.mR9ap, показали усиленные ответные реакции на более яркие вспышки по сравнению с неподвергавшимися лечению глазами. Это привело к повышению верхнего порога ответа до $\sim 2 \log$ единиц (фиг. 5А), мало влияя на максимальный фотоотклик (151 ± 17 мкВ в подвергавшихся лечению против 162 ± 29 мкВ в неподвергавшихся лечению глазах, среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего). Как и ожидалось, этот "фотопический сдвиг" в рабочем диапазоне палочек сопровождался обратным повышением нижнего порога ответа до $\sim 1,5 \log$ единиц. Между тем, верхний порог ЭРГ ответных реакций глаз дикого типа и глаз *Gnat1*^{-/-}, и те и те с функциональными колбочками, был увеличен на $\sim 4,0 \log$ единиц по сравнению с верхним порогом неподвергавшихся лечению глаз *Cnga3*^{-/-}. Были получены аналогичные результаты, когда гAAV2/8.Rho.mR9ap вводили мышам *Pde6c*^{-/-} (фиг. 9). Как следствие, лечение позволило палочкам реагировать на вспышки более длительной продолжительности (фиг. 5Б) и на вспышки при фоновом освещении, изолирующем колбочки (фиг. 5В). Эти включают условия, при которых неподвергавшиеся лечению палочки практически не реагируют.

В совокупности, эти результаты показали, что избыточная экспрессия R9AP в палочках приводит к падению их чувствительности и дает клеткам возможность приобрести фотопическую функцию в обмен на скотопическую функцию. Эта терапевтическая индукция "фотопического сдвига" функции палочек продолжалась, по крайней мере, в течение 5 месяцев без очевидных признаков дегенерации сетчатки (фиг. 10). Между тем, лечение мышей дикого типа с использованием тех же вирусных векторов не показало измеримого изменения функции сетчатки (фиг. 11).

Пример 8 - биполярный путь палочки приспособливает передачу сигналов палочки с измененной функцией.

В этой работе установлено, что избыточная экспрессия R9AP в палочках приводит к более быстрой кинетике деактивации фоторецепторов и позволяет нейрону реагировать на большее количество фотонов. Между тем, ускоренная деактивация также должна приводить к более короткой длительности высвобождения нейротрансмиттера на синаптическом конце фоторецептора. Поэтому было оценено, влияет ли лечение на нисходящую биполярную передачу сигналов палочками. Сначала изучали скорость и степень передачи сигналов от фоторецепторов к биполярным клеткам в ответ на короткую однократную вспышку, измеряя время до пика и амплитуды а-волны (исходящей из фоторецепторов) и b-волны (исходящей из биполярных клеток) с использованием ЭРГ (фиг. 6А). В целом, для подвергавшихся лечению и неподвергавшихся лечению глаз наблюдалась чуть меньшая, но почти идентичная кривая интенсивности ответной реакции для обеих волн - а-волны и b-волны. Наблюдаемая небольшая разница может отражать или истинное последствие ускоренной деактивации фоторецептора, или просто нейронное повреждение, вызванное субретинальной инъекцией. Время до пика а-волны обозначает точку, в которой b-волна, запускаемая биполярной клеткой, становится детектируемой. Мы также наблюдали небольшие задержки во времени до пика а-волны и b-волны, что указывает на небольшую задержку в передаче нейронных сигналов от фоторецепторов к биполярным клеткам. Тем не менее, относительно большая вариация ЭРГ ответных реакций между индивидами, указывающая на небольшую задержку или снижение ответной реакции палочек, не обязательно приводит к зрительной дисфункции (Birch and Anderson 1992).

Таким образом, эти результаты показали, что в принципе биполярные клетки почти полностью приспособляются к изменению функции фоторецептора и, что важно, демонстрируют соответствующее соотношение доза-реакция.

Пример 9 - избыточная экспрессия R9ар приводит к улучшению функции контрастной чувствительности.

Затем был задан вопрос о том, может ли "фотопический сдвиг" функции палочек, опосредованный избыточной экспрессией R9AP, как следствие переведен в улучшенную продуктивность зрительного восприятия под действием света, путем измерения оптокинетического ответа на вращающиеся синусоидальные решетки при наиболее ярких возможных условиях записи с помощью стандартного компьютерного монитора (62 кд/м^2) (Carvalho et al., 2011). Уникальное преимущество этого поведенческого теста заключается в том, что функцию зрения каждого глаза можно изучать отдельно; функция правого глаза может быть исследована путем ответной реакции на решетки, вращающиеся против часовой стрелки (ПЧС), а левого глаза - стимулами по часовой стрелке (ЧС) (Douglas et al., 2005). Функцию пространственной контрастной чувствительности (ФКЧ) изучали с помощью фиксированной временной частоты 6,0 Гц и обнаружили, что мыши Cnga3^{-/-} имели уменьшенную ФКЧ по сравнению с мышами дикого типа (фиг. 7). ФКЧ, функция контрастной чувствительности и остроты зрения, отображала оценочный диапазон зрительного восприятия (животные могли, по-видимому, воспринимать решетки под кривой, но не на ней; фиг. 7А). Весьма любопытно то, что наблюдалось 8,0-кратное ($P=0,005$) и 5,4-кратное ($P=0,011$) увеличение чувствительности применяя решетки как 0,128, так и 0,256 циклов/градус (ц/гр) соответственно, когда сравнивали контрастную чувствительность подвергавшегося лечению и неподвергавшегося лечению глаза (фиг. 7А слева). Не наблюдалось четкого изменения контрастной чувствительности для решеток 0,383 ($P=0,056$) и 0,511 ($P=0,111$) (ц/гр). Интересно отметить, что средняя чувствительность подвергавшегося лечению глаза у мышей Cnga3^{-/-} превышала среднюю чувствительность контролей дикого типа с нормально функционирующими колбочками. Однако, когда мышей дикого типа лечили той же вирусной конструкцией, ФКЧ не отличались между подвергавшимися лечению и неподвергавшимися лечению глазами (фиг. 12).

Установив, что избыточная экспрессия R9AP приводит к усилению продуктивности зрительного восприятия при просмотре максимально ярких настроек монитора, было предложено определить, устойчиво ли это усиление зрительного восприятия. Это вызывает серьезную озабоченность, учитывая, что регенерация зрительного пигмента в палочках, как известно, происходит значительно медленнее, чем регенерация в колбочках (Wang and Kefalov 2011). Во-первых, было оценено, влияет ли лечение на изменение скорости "обесцвечивания" зрительного пигмента. Было обнаружено, что воздействие яркого света на подвергавшиеся лечению и неподвергавшиеся лечению глаза в течение 5 мин не давало какой-либо разницы в количествах остаточного "обесцвечиваемого" зрительного пигмента (фиг. 7Б нижняя левая панель). Во-вторых, количество "обесцвечиваемого" родопсина в глазу изучалось после экспонирования мышей Cnga3^{-/-} в течение изменяющегося количества времени такому же экспериментальному параметру, применяемому для измерения ФКЧ. Результаты показали, что количество зрительного пигмента оставалось стабильным без проявления уменьшения в течение 2 ч воздействия зрительных стимулов, аналогично для подвергавшихся лечению и неподвергавшихся лечению глаз (нижняя правая панель на фиг. 7Б). Эти результаты показали, что прирост зрительного восприятия у подвергавшихся лечению мышей Cnga3^{-/-} поддерживается достаточным количеством молекул родопсина и является устойчивым.

Ссылки

- Curcio, C.A., et al. The Journal of comparative neurology 292, 497-523 (1990).
- Dryja, T.P. American journal of ophthalmology 130, 547-563 (2000).
- Hess, R.F. & Nordby, K. The Journal of physiology 371, 365-385 (1986).
- Nishiguchi, K.M., et al. Human mutation 25, 248-258 (2005).
- Kohl, S., et al. Nature genetics 19, 257-259 (1998).
- Chang, B. et al. P.N.A.S 106, 19581-19586 (2009).
- Thiadens, A. A., et al. American journal of human genetics 85, 240-247 (2009).
- Burns, M.E. & Pugh, E.N. Biophys J 97, 1538-1547 (2009).
- Burns, M.E. & Pugh, E.N. Physiology 25, 72-84 (2010). Baseler, H.A., et al Nature neuroscience 5, 364-370 (2002).
- Martemyanov, K.A. & Arshavsky, V.Y. Prog Mol Biol Transl 86, 205-227 (2009).
- Krispel, C.M., et al. Neuron 51, 409-416 (2006).
- Cowan, C.W., et al. P.N.A.S. 95, 5351-5356 (1998).
- Zhang, X., Wensel, T.G. & Kraft, T.W. The Journal of neuroscience: the official journal of the

- Society for Neuroscience 23, 1287-1297 (2003).
- Nishiguchi, K.M., et al. *Nature* 427, 75-78 (2004).
- Michaelides, M., et al. *Ophthalmology* 111, 120-127 e121 (2010).
- Han, X. et al. *Front Syst Neurosci.* 5, 18 (2011).
- Busskamp, V., et al. *Science* 329, 413-417 (2010).
- Fu, Y., Yau, K.W. *Pflugers Arch.* 454, 805-819 (2007).
- Pugh, E.N. Jr et al. *Curr Opin Neurobiol.* 9, 410-418 (1999).
- de Jong, P.V.T.M. *N Engl J Med* 355, 1474-1485 (2006).
- Wassle, H. *Nat Rev Neurosci.* 5, 747-757 (2004).
- Soucy, E. et al. *Neuron* 21, 481-493 (1998).
- Hack, I. et al. *P.N.A.S* 96, 14130-14135 (1999).
- Li, W. et al. *Nat Neurosci* 13, 414-416 (2010).
- Biel, M. et al. *P.N.A.S* 96, 7553-7557 (1999).
- Umino, Y. et al. *J Neurosci* 28, 189-198 (2008).
- Cangiano, L. et al. *J Physiol.* 590, 3841-3855 (2012).
- Berndt, A. et al. *Science* 344, 420-424 (2014).
- Wietek, J. et al. *Science* 344, 409-412 (2014).
- Calvert, P.D. et al. *P.N.A.S* 97, 13913-13918 (2000).
- Gao, G.P. et al. *P.N.A.S* 99, 11854-11859 (2002).
- Lyubarsky, A.L., et al. *Vision research* 44, 3235-3251 (2004).
- Weymouth, A.E. & Vingrys, A. J. *Progress in retinal and eye research* 21, 1-44 (2008).
- Seeliger, M.W., et al. *Nature genetics* 29, 70-74 (2001).
- Douglas, R.M., et al. *Visual neuroscience* 22, 677-684 (2005).
- Douglas, R.H., et al. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 111, 111-122 (1995). Longbottom, R., et al. *P.N.A.S.* 106, 18728-18733 (2009).
- Lyubarsky, A.L. & Pugh, E.N., Jr. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 563-571 (1996).
- Birch, D.G. & Anderson, J.L. *Archives of ophthalmology* 110, 1571-1576 (1992). Carvalho, L.S., et al. *Human molecular genetics* 20, 3161-3175 (2011).
- Wang, J.S. & Kefalov, V.J. *Progress in retinal and eye research* 30, 115-128 (2011).
- Taylor, A. W., *Ocular immune privilege, Eye*, 23, 1885-1889 (2009).
- Natkunarah, M. et al, *Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8, Gene Ther.* 15, 463-467 (2008).
- Choi, V. W. et al, *AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery, Curr. Gene Ther.*, 5, 299-310 (2005).
- Wu, Z. et al, *Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy, Mol. Ther.*, 14, 316-327 (2006). Chuong, A.S. et al, *Non-invasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin, Nat Neurosci.*, 17, 1123-1129 (2014).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения зрения у пациента с дисфункцией и/или деградацией фоторецепторов-колбочек, включающий:

обеспечение вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ArchT и/или белок R9AP, и

введение указанного вектора в здоровые фоторецепторы-палочки в сетчатке пациента с экспрессией указанной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ArchT и/или белок R9AP, в них же таким образом, что диапазон интенсивностей освещения, на который реагирует фоторецептор-палочка, увеличивается, и/или увеличивается скорость, с которой фоторецептор-палочка реагирует на свет, где капсид AAV вектора получен из AAV8, и

нуклеиновую кислоту экспрессируют под контролем промотора, специфичного для палочек.

2. Способ по п.1, где геном AAV вектора получен из AAV2.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где пациент страдает от дегенерации жёлтого пятна, ахроматопсии или амавроза Лебера.

4. Способ по п.3, где дегенерация желтого пятна может быть возрастной дегенерацией жёлтого пятна (ВДЖП), например наследственной дегенерацией желтого пятна, или наследственной дегенерацией колбочек.

5. Способ по п.4, где ВДЖП является мокрой (неоваскулярной) ВДЖП или географической атрофией сетчатки.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где передача сигнала фоторецептора-палочки расширяется в мезопическом и/или фотопическом диапазоне освещения.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где палочка проявляет улучшенную интенсивность изменения и/или ускоренную кинетику активации/инактивации.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где вектор вводят в фоторецепторы-палочки *in vitro* с последующей трансплантацией в сетчатку.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где мезопическое и/или фотопическое зрение пациента улучшается.

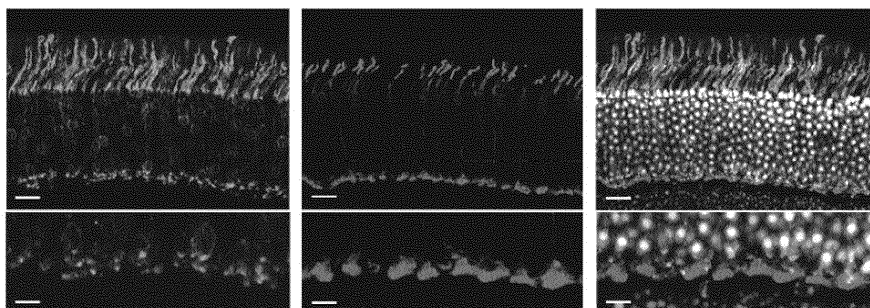
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанный промотор представляет собой промотор родопсина (Rho), промотор белка с лейциновой застёжкой, специфичного для нейронов сетчатки (NRL), или промотор фосфодиэстеразы 6B (PDE6B).

11. Применение вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) в изготовлении лекарственного средства для лечения дисфункции и/или деградации фоторецепторов-колбочек, где AAV вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую генный продукт, функционально связанную со специфичным для палочек промотором, где указанный генный продукт представляет собой ArchT или R9AP, и капсид AAV вектора получен из AAV8.

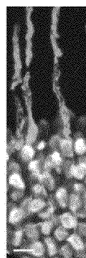
12. Применение по п.11, где указанный промотор представляет собой промотор родопсина (Rho), промотор белка с лейциновой застёжкой, специфичного для нейронов сетчатки (NRL), или промотор фосфодиэстеразы 6B (PDE6B).

13. Применение по п.11, где AAV вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ArchT или белок R9AP, где капсид AAV вектора получен из AAV8 и указанная нуклеиновая кислота находится под контролем промотора, специфичного для палочек.

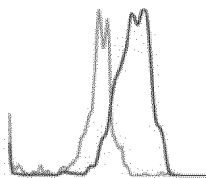
14. Применение по любому из пп.11-13, где геном AAV вектора получен из AAV2.



Фиг. 1А

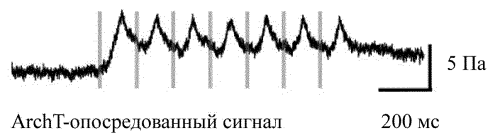


Фиг. 1Б

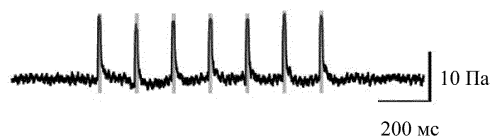


Фиг. 1В

Прошли темновую адаптацию + 9cis

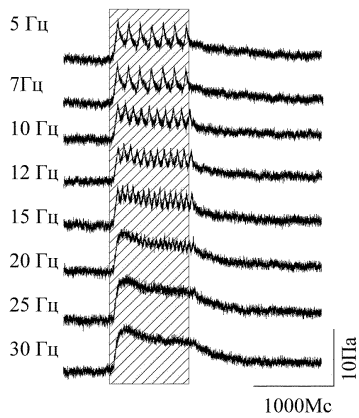


ArchT-опосредованный сигнал



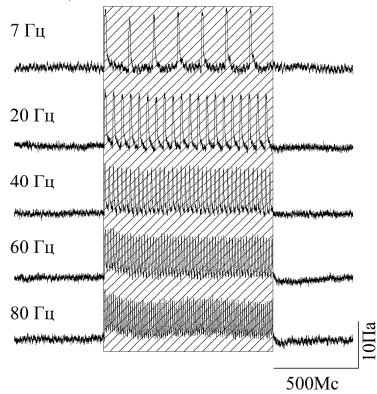
Фиг. 1Г

C57BL6, Неинъектированные



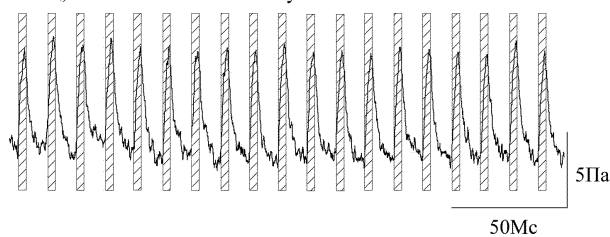
Фиг. 2А

PDE6C, ArchT

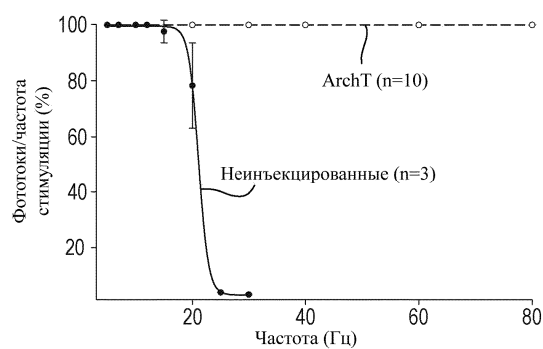


Фиг. 2Б

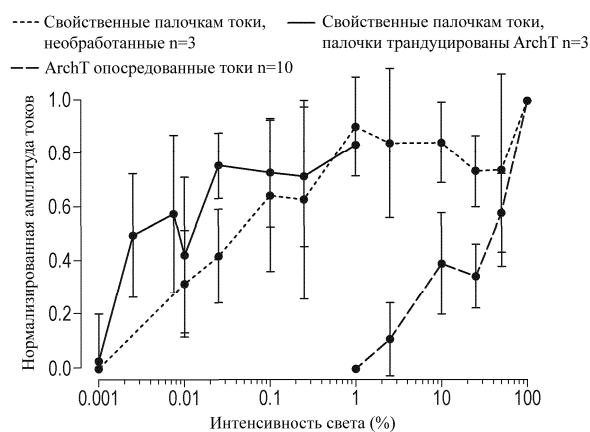
80 Гц, 5 мс интенсивность импульса



Фиг. 2В



Фиг. 2Г

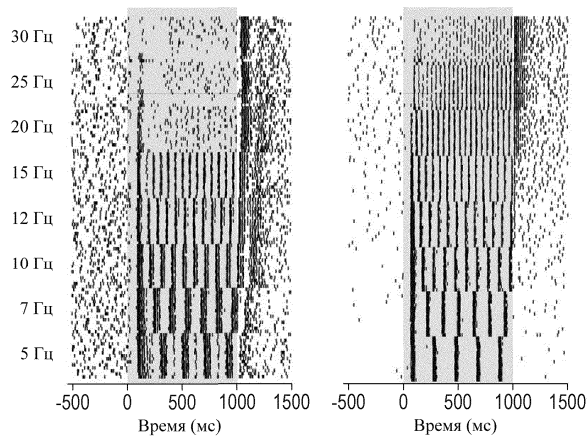


Фиг. 2Д

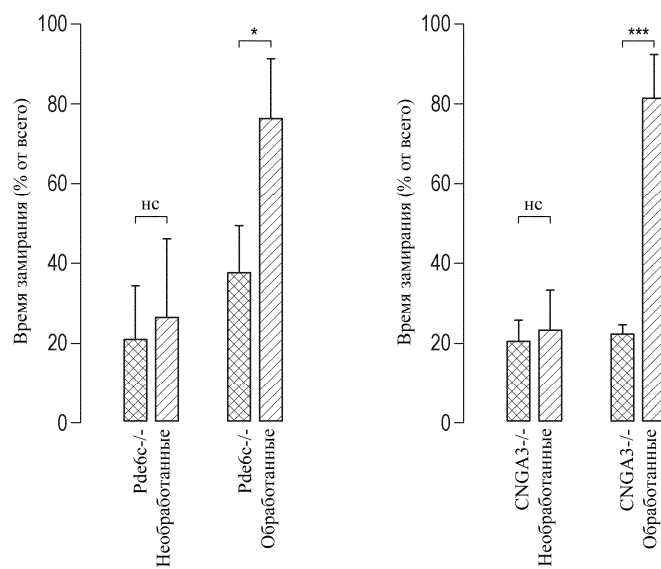
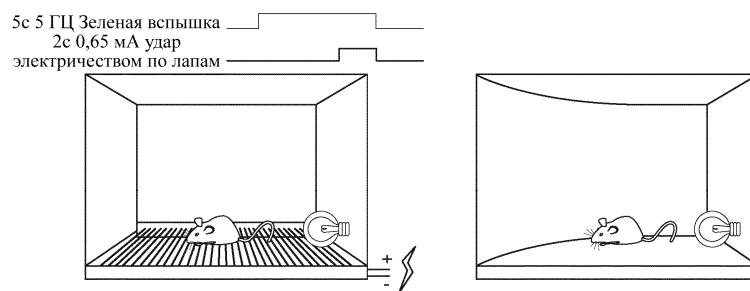
PDE6C ArchT обработанные

Прошли темновую адаптацию, 9-cis, световая интенсивность 0,01 %

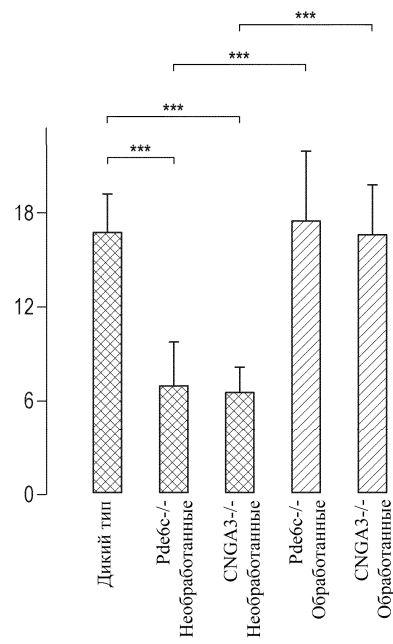
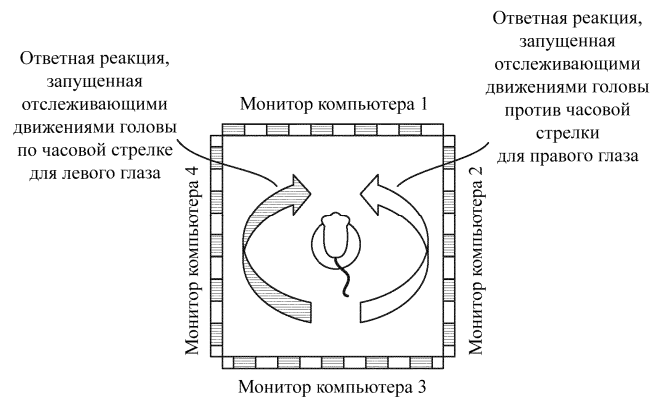
Прошли световую адаптацию, световая интенсивность 100%



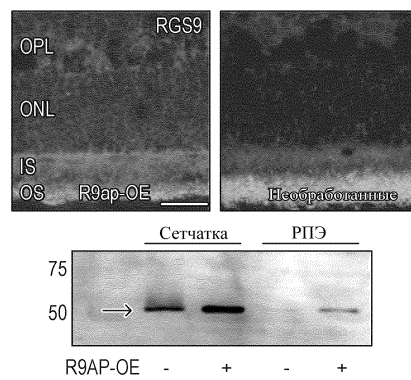
Фиг. 2Е



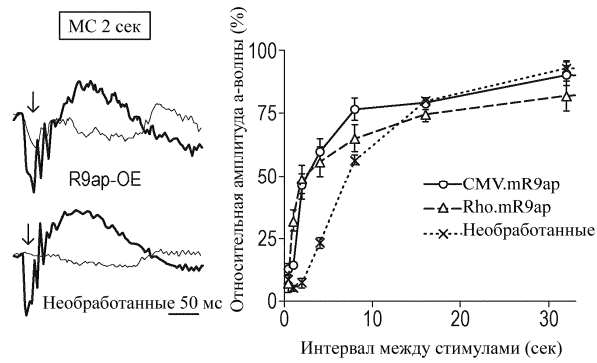
Фиг. 3А



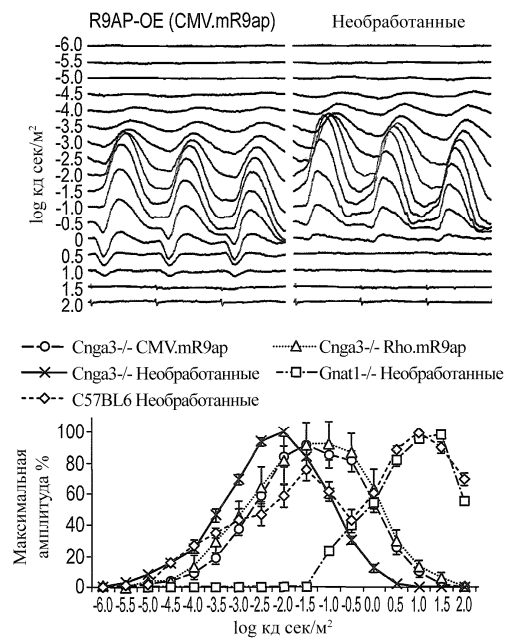
Фиг. 3Б



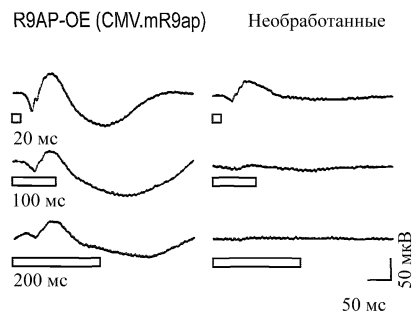
Фиг. 4А



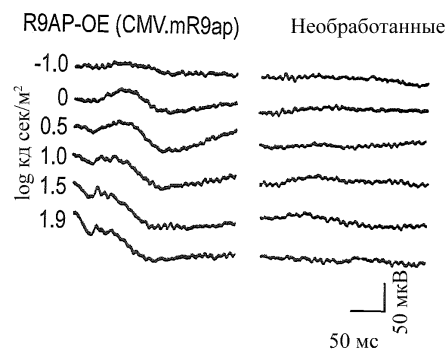
Фиг. 4Б



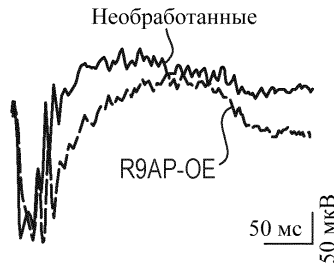
Фиг. 5А



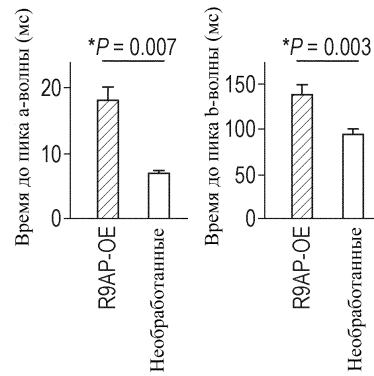
Фиг. 5Б



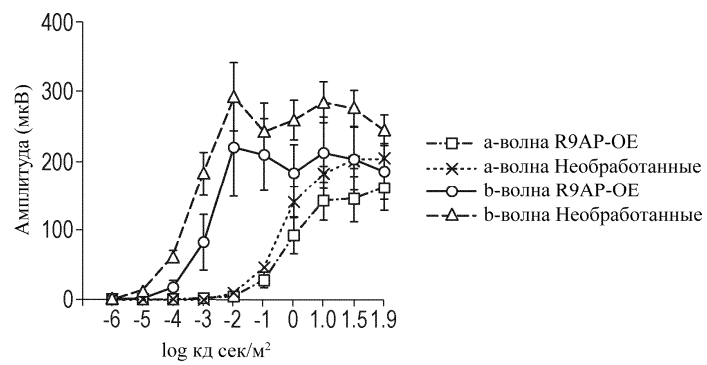
Фиг. 5В



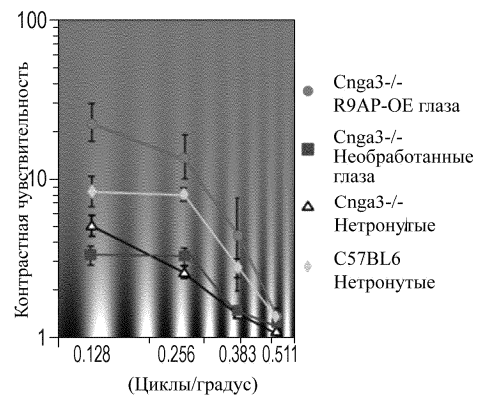
Фиг. 6А



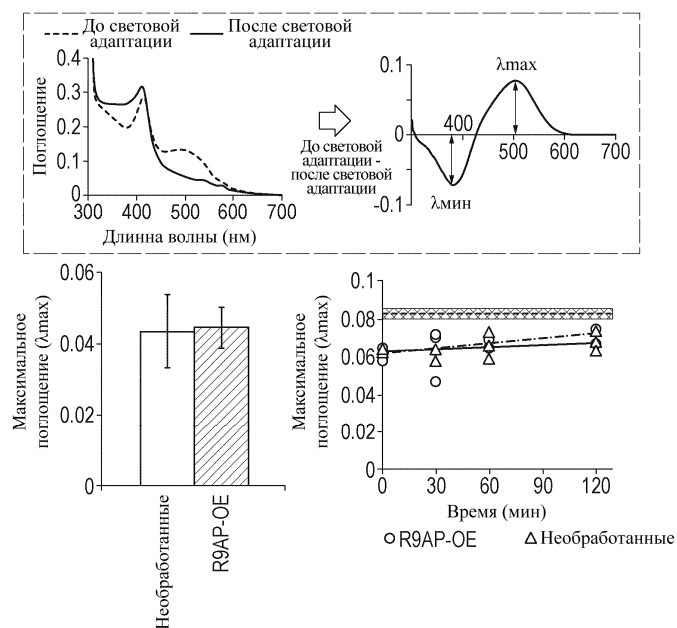
Фиг. 6Б



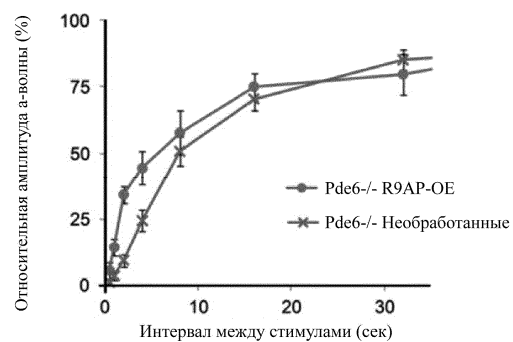
Фиг. 6В



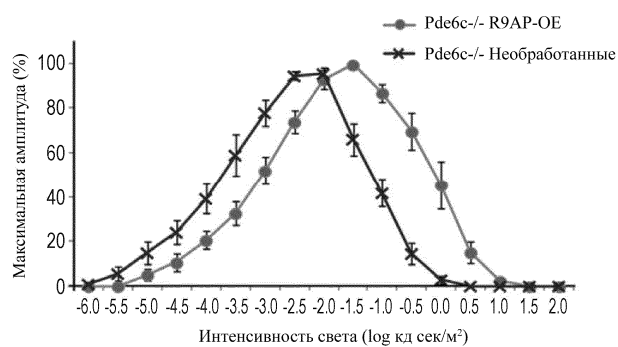
Фиг. 7А



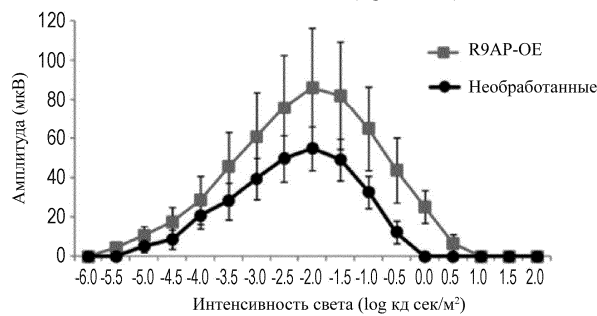
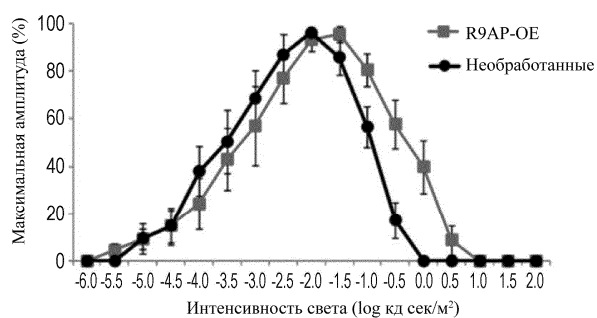
Фиг. 7Б



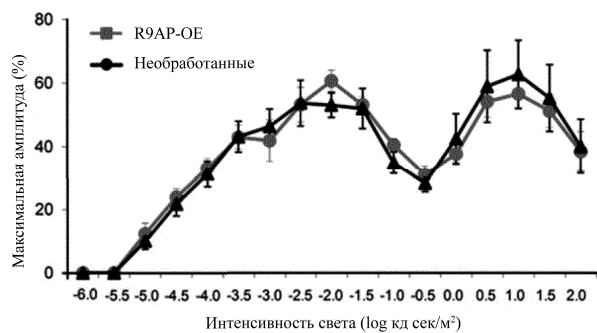
Фиг. 8



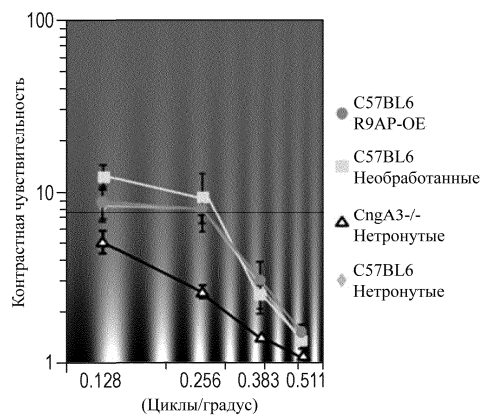
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

