

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293298** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.15

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.13

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННОЙ С GJB2 ПОТЕРИ СЛУХА

(31) 63/024,468; 63/152,835

(32) 2020.05.13; 2021.02.23

(33) US

(86) PCT/US2021/032354

(87) WO 2021/231808 2021.11.18

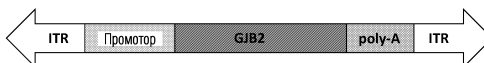
(88) 2021.12.23

(71) Заявитель:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Саймонс Эммануэль Джон, Нг Роберт,
Ленц Дэниел Р., Чжанг Хао (US)

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

(57) В изобретении представлены конструкции, содержащие кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует белок коннексин 26. Иллюстративные конструкции включают AAV конструкции. Также представлены способы применения раскрытых конструкций для лечения потери слуха и/или глухоты.



202293298

A1

A1

202293298

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576467EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННОЙ С GJB2 ПОТЕРИ СЛУХА

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 63024/468, поданной 13 мая 2020 года и предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/152835, поданной 23 февраля 2021 года, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (название: 4833_006PC02_Seqlisting_ST25.txt; размер: 227027 байт; и дата создания: 13 мая 2021 года), поданного с заявкой, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей вследствие поражения слухового прохода или среднего уха), нейросенсорной (возникающей вследствие поражения внутреннего уха или слухового нерва) или смешанной. Большинство форм несиндромальной глухоты связаны с постоянной потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота), хотя некоторые формы могут включать изменения в среднем ухе (кондуктивная потеря слуха). Подавляющее большинство нейросенсорной потери слуха человека вызвано аномалиями в волосковых клетках кортиевого органа в улитке (плохое функционирование волосковых клеток). Волосковые клетки могут быть аномальными при рождении или могут повреждаться в течение жизни человека (например в результате акустической травмы или инфекции).

Сущность настоящего изобретения

[0004] В настоящем раскрытии утверждается, что заболевания или состояния, связанные с потерей слуха, можно лечить, например, путем замены или добавления определенных генных продуктов. Кроме того, в настоящем раскрытии показано, что генные продукты, участвующие в развитии, функционировании и/или сохранении клеток внутреннего уха, могут быть полезны для лечения заболеваний или состояний, связанных с потерей волосковых клеток и/или поддерживающих клеток. Таким образом, в настоящем раскрытии представлено введение композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, участвующих в развитии, функционировании и/или сохранении клеток внутреннего уха, включая поддерживающие клетки и волосковые клетки и/или применение таких композиций при лечении потери слуха или заболеваний или состояний, связанных с потерей слуха. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может быть закодирован геном щелевых контактов бета-2 (GJB2) (ген GJB2 кодирует белок коннексин 26) или его характеристической частью. В некоторых вариантах осуществления генным продуктом может быть белок коннексин 26 (закодирован геном GJB2) или его

характеристическая часть.

[0005] кроме того, в настоящем раскрытии показано, что частицы AAV могут быть полезны для введения композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, участвующих в развитии, функционировании и/или сохранении клеток внутреннего уха и/или лечения потери слуха или заболеваний или состояний, связанных с потерей слуха., как описано в настоящем документе, частицы AAV содержат (i) полинуклеотидную конструкцию AAV (например полинуклеотидную конструкцию рекомбинантного AAV (гAAV)) и (ii) капсид, содержащий капсидные белки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная конструкция AAV содержит ген GJB2 или его характеристическую часть.

[0006] кроме того, в настоящем раскрытии представлены композиции, содержащие полинуклеотидные конструкции, содержащие ген GJB2 или его характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления конструкция может дополнительно содержать регуляторные элементы, функционально соединенные с кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления включенные регуляторные элементы облегчают тканеспецифическую экспрессию на физиологически приемлемых уровнях.

[0007] Также в настоящем документе представлены способы введения конструкций и композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления введение включает хирургическое вмешательство и доставку частиц гAAV, содержащих терапевтические конструкции. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV можно доставлять во внутреннее ухо нуждающегося в этом субъекта путем хирургического введения через вторичную барабанную перепонку. В некоторых вариантах осуществления эффективность вмешательства определяют с помощью утвержденных тестов, а измерения сравнивают с известными контрольными измерениями.

Краткое описание чертежей

[0008] Фиг. 1 на панели (А) представлен упрощенный эндогенный AAV геном; на панели (В) представлена упрощенная конструкция рекомбинантного AAV (гAAV), способная экспрессировать ген GJB2.

[0009] Фиг. 2А-2О показаны панели (А)-(О), на которых представлены альтернативные иллюстративные конструкции гAAV, содержащие ген GJB2. На фиг. 2А представлена гAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор CAG, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2В представлена гAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор CAG, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2С представлена гAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор GJB2, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, полиА bGH, домен С3 и 5'-ITR. На фиг. 2D представлена гAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор GJB2, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, полиА bGH, домен D7 и 3'-ITR. На фиг. 2Е представлена гAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор GJB2, ген hGJB2, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2F представлена гAAV конструкция, содержащая

5'-ITR, промотор CAG, 5'-UTR, ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2G представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор smCBA, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2H представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор, содержащий промотор CMV и промотор hGJB2, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2I представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор, содержащий промотор CMV и промотор GFAP, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2J представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор, специфический для поддерживающих клеток внутреннего уха GFAP, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2K представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор CAG, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, дестабилизирующий домен, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2L представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор, содержащий энхансер hGJB2 и промотор hGJB2, 5'-UTR, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2M представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор CAG, 5'-UTR, промотор hGJB2, ген hGJB2, метку FLAG, регуляторный сайт-мишень микроРНК, 3'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2N представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор, содержащий промотор, специфический для поддерживающих клеток внутреннего уха и минимальный промотор hGJB2, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, 5'-UTR, полиА bGH и 3'-ITR. На фиг. 2O представлена gAAV конструкция, содержащая 5'-ITR, промотор CAG, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген hGJB2, метку FLAG, элемент T2A, нуклеиновую кислоту, кодирующую eGFP, полиА bGH и 3'-ITR.

[0010] Фиг. 3 представлена экспрессия белка коннексина 26 (Cx26)/GJB2 из клеток HEK293FT, которые были подвергнуты воздействию иллюстративных конструкций, описанных в настоящем документе. На панели (А) представлена экспрессия белка Cx26 в клетках HEK293FT, которые были трансфицированы иллюстративными конструкциями gAAV, содержащими промоторы CAG, отмечены полосы, соответствующие винкулину и Cx26. На панели (В) представлена экспрессия белка GJB2 в клетках HEK293FT, которые были трансфицированы иллюстративными конструкциями, содержащими последовательности, кодирующие hGJB2, причем, как отмечено, последовательностями 5'-UTR и 3'-UTR GJB2 управляют промоторные/энхансерные последовательности CAG, CMVe-GJB2p или smCBA, отмечены полосы, соответствующие GAPDH и GJB2-FLAG. На панели (С) представлена экспрессия белка GJB2 в клетках HEK293FT, которые были трансдуцированы иллюстративными частицами gAAV, содержащими конструкции, содержащие последовательности, кодирующие hGJB2, причем, как отмечено, последовательностями 5'-UTR и 3'-UTR GJB2 управляют промоторные/энхансерные последовательности CAG, CMVe-GJB2p или smCBA, отмечены полосы, соответствующие GAPDH и GJB2-FLAG, положительным контролем является последовательность,

кодирующая hGJB2, управляемая промотором/энхансером CAG без 5'-UTR или 3'-UTR GJB2.

[0011] Фиг. 4 представлены результаты количественной PCR (qPCR) экспрессии мРНК GJB2 в клетках HEK293FT и эксплантатах неонатального CD1 дикого типа, которые были трансдуцированы иллюстративными конструкциями gAAV.

[0012] Фиг. 5, на панелях (A) и (B) показана экспрессия белка eGFP в клетках HEK293T под действием различных иллюстративных промоторов, клетки сортировали и количественно измеряли через 72 часа после трансфекции.

[0013] Фиг. 6 представлена экспрессия белка FLAG в мышинных кохлеарных эксплантатах, трансдуцированных в P2 иллюстративными частицами gAAVAnc80, содержащими конструкции, управляемые, как отмечено, промоторными/энхансерными последовательностями CAG, CMVe-GJB2p или smCBA, эксплантаты фиксировали через 72 часа иммуноокрашивание на FLAG отмечено зеленым иммуноокрашивание на маркер Myo7a волосковых клеток отмечено красным, а ядерный маркер DAPI отмечен синим. На панели (A) представлены иллюстративные эксплантаты, трансдуцированные AAVAnc80-CAG,5UTR.hGJB2,3F,3UTR (SEQ ID NO: 82) по 5,8E9 гв/эксплантат. На панели (B) представлены иллюстративные эксплантаты, трансдуцированные AAVAnc80-smCBA,5UTR.hGJB2,3F,3UTR (SEQ ID NO: 83) по 1,4E10 гв/эксплантат. На панели (C) представлены иллюстративные эксплантаты, трансдуцированные AAVAnc80-CMVeGJB2p,5UTR.hGJB2,3F,3UTR (SEQ ID NO: 84) по 1,8E10 гв/эксплантат.

[0014] Фиг. 7 представлена экспрессия *in vitro* белка GJB2 в клетках HEK293FT, трансфицированных конструкциями CAG,5UTR.hGJB2.FLAG.miRTS,3UTR (SEQ ID NO: 87), CAG,5UTR.hGJB2.FLAG,3UTR (SEQ ID NO: 82) или CAG,5UTR.hGJB2.FLAG.GFP. CAG,5UTR.hGJB2.FLAG.miRTS,3UTR содержит сайты, нацеленные на миРНК (miRTS) для miR-182 и miR-183 в 3UTR, чтобы обеспечить нокдаун экзогенного hGJB2 в присутствии регуляторного miR-182 и/или miR-183. Для подтверждения регуляции миРНК конструкций клетки HEK293FT трансфицировали плазмидами, содержащими hGJB2 и необязательно совместно трансфицировали плазмидами (+) или нет (-), экспрессирующими miR-182 и miR-183. Через 72 часа после трансфекции клетки собирали для анализа белка и РНК. На панели (A) представлены иллюстративные уровни белка GJB2, которые анализировали с использованием вестерн-блоттинг; на панели (B) представлены иллюстративные уровни мРНК GJB2, которые анализировали с использованием qPCR.

[0015] Фиг. 8 представлен вид в перспективе устройства для доставки текучей среды во внутреннее ухо согласно аспектам настоящего раскрытия.

[0016] Фиг. 9 представлен вид сбоку узла с изогнутой иглой согласно аспектам настоящего раскрытия.

[0017] Фиг. 10 представлен вид в перспективе устройства для доставки текучей среды во внутреннее ухо согласно аспектам настоящего раскрытия.

[0018] Фиг. 11 представлен вид в перспективе узла с изогнутой иглой, соединенного с дистальным концом устройства, согласно аспектам настоящего раскрытия.

[0019] Фиг. 12 представлена экспрессия *in vivo* коннексина 26 у мышей дикого типа (p20), которым в улитку вводили частицы rAAV_{Anc80}, содержащие CAG.hGJB2.F.GFP (схематично представленную на фиг. 20). Экспрессию коннексина 26 в поддерживающих клетках и внутренних волосковых клетках определяли через 10 дней после введения. Иммуноокрашивание фаллоидином актиновых нитей и пучков стереоцилий волосковых клеток отмечено синим, GFP отмечено зеленым, FLAG отмечено фиолетовым, а эндогенный коннексин 26 отмечен красным. SC - поддерживающие клетки; ИНС - внутренние волосковые клетки; ОНС - наружные волосковые клетки.

Определения

[0020] объем настоящего раскрытия определен формулой изобретения, приложенной к настоящему изобретению и не ограничен определенными вариантами осуществления описанными в настоящем документе. Специалистам в данной области при чтении настоящего описания будут понятны различные модификации, которые могут быть эквивалентны таким описанным вариантам осуществления или иным образом входить в объем формулы изобретения. В общем, термины использованные в настоящем документе, соответствуют значению, понятному в данной области, если явно не указано иное. Точные определения некоторых терминов представлены ниже; значения этих и других терминов в конкретных случаях по всему этому описанию будут понятны специалистам в данной области из контекста.

[0021] Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и так далее, в формуле изобретения для изменения элемента формулы само по себе не означает какой-либо приоритет, старшинство или порядок одного элемента формулы над другим или временный порядок, в котором выполняют действия способа, но их используют просто в качестве меток, чтобы отличить один элемент формулы имеющий определенное название, от другого элемента имеющего такое же название (но для использования порядкового термина), чтобы отличить элементы формулы.

[0022] Следует понимать, что формы единственного числа используемые в данном документе, включают ссылки на множественное число, если явно не указано иное. Пункты формулы изобретения или описание, которые включают «или» между одним или несколькими членами группы, считаются удовлетворенными, если один, несколько или все члены группы присутствуют используются или иным образом имеют отношение к данному продукту или способу, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста. В некоторых вариантах осуществления присутствует используется или иным образом имеет отношение к данному продукту или способу ровно один член группы. В некоторых вариантах осуществления присутствуют используются или иным образом имеют отношение к данному продукту или способу более одного или все члены группы. Следует понимать, что настоящее раскрытие охватывает все варианты, комбинации и перестановки, когда одно или несколько ограничений, элементов, положений, описательных терминов и так далее из одного или нескольких перечисленных пунктов формулы изобретения введены в другой пункт формулы изобретения, зависящий от того же базового пункта формулы (или,

в зависимости от обстоятельств, от любого другого пункта формулы), если не указано иное или если специалисту в данной области не будет очевидно, что возникнет противоречие или несоответствие. Когда элементы представлены в виде списков (например, в группе Маркуша или аналогичном формате), следует понимать, что каждая подгруппа элементов также раскрыта и из группы может быть удален любой элемент (элементы). Следует понимать, что в целом, когда варианты осуществления или аспекты упоминаются как «содержащие» определенные элементы, признаки и так далее, определенные варианты осуществления или аспекты «состоят» или «по существу состоят из» таких элементов, признаков и так далее. В целях простоты эти варианты осуществления не в каждом случае были также подробно специально изложены в данном документе. Также следует понимать, что любой вариант осуществления или аспект может быть явно исключен из формулы изобретения, независимо от того, указано ли конкретное исключение в описании.

[0023] По всему описанию, всякий раз, когда полинуклеотид или полипептид представлен в виде последовательности букв (например, в случае полинуклеотида А, С, G и Т, которые обозначают аденозин, цитидин, гуанозин и тимидин, соответственно), такие полинуклеотиды или полипептиды представлены в порядке от 5' к 3' или от N-конца к С-концу, слева направо.

[0024] Введение: В рамках настоящего изобретения термин «введение» обычно относится к введению композиции субъекту или в систему для обеспечения доставки средства субъекту или в систему. В некоторых вариантах осуществления средство находится или включено в композицию; в некоторых вариантах осуществления средство вырабатывается за счет метаболизма композиции или одного или нескольких ее компонентов. Рядовым специалистам в данной области будет понятно множество путей, которые в соответствующих обстоятельствах можно использовать для введения субъекту, например человеку. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть системным или местным. В некоторых вариантах осуществления системное введение может быть внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение может быть местным. Местное введение может включать доставку в кохлеарную перилимфу, например, путем инъекции через вторичную барабанную перепонку или в барабанную лестницу инъекции в улитковый проток через эндолимфу, перилимфу и/или эндолимфу после каналостомии. В некоторых вариантах осуществления введение может включать только одну дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может включать использование фиксированного числа доз. В некоторых вариантах осуществления введение может включать прерывистое введение дозы (например множество доз, разделенных во времени) и/или периодическое введение дозы (например отдельные дозы, разделенные одинаковым периодом времени). В некоторых вариантах осуществления введение может включать непрерывное введение дозы (например перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

[0025] Аллель: В рамках настоящего изобретения термин «аллель» относится к одному из двух или более существующих генетических вариантов конкретного

полиморфного геномного локуса.

[0026] Улучшение: В рамках настоящего изобретения термин «улучшение» относится к предотвращению, уменьшению или смягчению состояния или улучшению состояния субъекта. Улучшение может включать в себя, но не требует, полного выздоровления или полного предотвращения заболевания, нарушения или состояния.

[0027] Аминокислота: В самом широком смысле в рамках настоящего изобретения термин «аминокислота» относится к любому соединению и/или веществу, которое может быть включено в полипептидную цепь, например через образование одной или нескольких пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру, например $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой неприродную аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. «Стандартная аминокислота» относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно встречающихся в природных пептидах. «Нестандартная аминокислота» относится к любой аминокислоте, кроме стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетическим путем или получена из натурального источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, включая карбокси- и/или аминоконцевую аминокислоту в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, которая показана выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована за счет метилирования, амидирования, ацетилирования, пэгилирования, гликозилирования, фосфорилирования и/или замены (например аминокислотной группы, группы карбоновой кислоты, одного или нескольких протонов и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например изменять период полужизни в кровотоке полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим идентичную в остальном немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет соответствующую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим идентичную в остальном немодифицированную аминокислоту.

[0028] Приблизительно или Примерно: В рамках настоящего изобретения термины «приблизительно» или «примерно» могут быть применимы к одному или нескольким представляющим интерес значениям, включая значение, похожее на заявленное эталонное значение. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы $\pm 10\%$ (более или менее) заявленного эталонного значения, если не указано иное или иное не следует из контекста (за исключением случаев, когда такое число превысит 100% возможного значения). Например, в некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или

«примерно» может включать в себя диапазон значений в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее эталонного значения.

[0029] Связанный: В рамках настоящего изобретения термин «связанный» описывает два события или объекта, как «связанные» друг с другом, если наличие, уровень и/или форма одного коррелирует с наличием, уровнем и/или формой другого. Например, считается, что конкретный объект (например полипептид, генетический профиль, метаболит, микроорганизм и так далее) связан с конкретным заболеванием, нарушением или состоянием, если его наличие, уровень и/или форма коррелирует с частотой возникновения и/или предрасположенностью к заболеванию, нарушению или состоянию (например, в соответствующей популяции). В некоторых вариантах осуществления два или более объекта физически «связаны» друг с другом, если они взаимодействуют, прямо или непрямо, так, что они находятся и/или остаются в физической близости друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два или более объекта, физически связанные друг с другом, связаны друг с другом ковалентно; в некоторых вариантах осуществления два или более объекта, физически связанные друг с другом, связаны друг с другом не ковалентно, но нековалентно связаны, например, за счет водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнитных свойств и их комбинаций.

[0030] Биологически активный: В рамках настоящего изобретения термин «биологически активный» относится к наблюдаемому биологическому эффекту или результату, достигаемому за счет представляющего интерес средства или объекта. Например, в некоторых вариантах осуществления биологической активностью является специфическое связывающее взаимодействие. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является модуляция (например индукция, усиление или ингибирование) биологического пути или события. В некоторых вариантах осуществления наличие или степень биологической активности оценивают путем обнаружения прямого или непрямого продукта, вырабатываемого за счет представляющего интерес биологического пути или события.

[0031] Селективный к клеткам промотор: В рамках настоящего изобретения термин «селективный к клеткам промотор» относится к промотору, который является преимущественно активным в некоторых типах клеток (например транскрипция конкретного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регулирующие и/или управляющие транскрипцией белки, которые связываются с тканеспецифическим промотором). В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор, который является преимущественно активным в одной или нескольких поддерживающих клетках внутреннего уха.

[0032] Характеристическая часть: В рамках настоящего изобретения термин «характеристическая часть» в самом широком смысле относится к части вещества, наличие (или отсутствие) которого коррелирует с наличием (или отсутствием) конкретного признака, свойства или активности вещества. В некоторых вариантах осуществления характеристическая часть вещества представляет собой часть, которая находится в данном

веществе и в родственных веществах, которые обладают общим конкретным признаком, свойством или активностью, но не в тех, которые не обладают общим конкретным признаком, свойством или активностью. В некоторых вариантах осуществления характеристическая часть имеет по меньшей мере одну общую функциональную характеристику с интактным веществом. Например, в некоторых вариантах осуществления «характеристическая часть» белка или полипептида представляет собой характеристическую часть, которая содержит непрерывный участок аминокислот или набор непрерывных участков аминокислот, которые вместе являются характерными для белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый такой непрерывный участок обычно содержит по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 50 или более аминокислот. В общем, характеристическая часть вещества (например белка, антитела и так далее) представляет собой часть, которая в дополнение к указанной выше последовательности и/или структурной идентичности имеет по меньшей мере одну общую функциональную характеристику с соответствующим интактным веществом. В некоторых вариантах осуществления характеристическая часть может быть биологически активной.

[0033] Характеристическая последовательность: В рамках настоящего изобретения термин «характеристическая последовательность» представляет собой последовательность, которая находится во всех элементах семейства полипептидов или нуклеиновых кислот и, следовательно, может быть использован рядовыми специалистами в данной области для определения элементов семейства.

[0034] Элемент характеристической последовательности: В рамках настоящего изобретения фраза «элемент характеристической последовательности» относится к элементу последовательности, находящемуся в полимере (например в полипептиде или нуклеиновой кислоте), который представляет характеристическую часть этого полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие элемента характеристической последовательности коррелирует с наличием или уровнем конкретной активности или свойством полимера. В некоторых вариантах осуществления наличие (или отсутствие) элемента характеристической последовательности определяет конкретный полимер как элемент (или не элемент) конкретного семейства или группы таких полимеров. элемент характеристической последовательности обычно содержит по меньшей мере два мономера (например аминокислоты или нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления элемент характеристической последовательности содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более мономеров (например смежных связанных мономеров). В некоторых вариантах осуществления элемент характеристической последовательности содержит по меньшей мере первый и второй участки смежных мономеров, разделенные одной или несколькими спейсерными областями, длина которых может меняться или не меняться в полимерах, которые обладают общим элементом последовательности.

[0035] Комбинированная терапия: В рамках настоящего изобретения термин «комбинированная терапия» относится к тем ситуациям, когда субъекта одновременно

подвергают воздействию двух или более терапевтических схем (например двух или более терапевтических средств). В некоторых вариантах осуществления два или более средства можно вводить одновременно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства можно вводить последовательно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства можно вводить по схеме с перекрывающимся введением доз.

[0036] Сопоставимые: В рамках настоящего изобретения термин «Сопоставимые» относится к двум или более средствам, объектам, ситуациям, наборам условий, субъектов, популяций и так далее, которые могут быть не идентичны друг к другу, но которые являются достаточно похожими, чтобы обеспечить сравнение между ними, чтобы специалисту в данной области было понятно, что выводы можно обоснованно сделать на основе наблюдаемых различий или сходств. В некоторых вариантах осуществления сопоставимые наборы средств, объектов, ситуаций, наборов условий, субъектов, популяций и так далее характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим числом отличающихся признаков. Рядовым специалистам в данной области в контексте будет понятно, какая степень идентичности требуется в любых данных обстоятельствах, чтобы два или более таких агентов, объектов, ситуаций, наборов условий, субъектов, популяций и так далее считались сопоставимыми. Например, рядовым специалистам в данной области должно быть понятно, что наборы средств, объектов, ситуаций, наборов условий, субъектов, популяций и так далее сопоставимы друг к другу, когда характеризуются достаточным числом и типом по существу идентичных признаков, чтобы гарантировать обоснованный вывод о том, что различия в полученных результатах или явлениях, наблюдаемых при различных обстоятельствах, стимулах, средствах, объектах, ситуациях, наборах условий, субъектах, популяций и так далее вызваны или указывают на различия отличающихся признаков.

[0037] Конструкция: В рамках настоящего изобретения термин «конструкция» относится к композиции, содержащие полинуклеотид, способный содержать по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления конструкцией может быть плазида, транспозон, космида искусственная хромосома (например искусственная хромосома человека (НАС) искусственная хромосома дрожжей (УАС) искусственная хромосома бактерий (ВАС) или полученная из P1 искусственная хромосома (РАС)) или вирусная конструкция и любые плазмиды Gateway®. Конструкция может, например содержать достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; клетка-хозяин примата или система экспрессии *in vitro* может поставлять другие элементы для экспрессии. Конструкция может содержать любой генетический элемент (например плазмиду, транспозон, космиду искусственную хромосому или вирусную конструкцию и так далее), который способен реплицироваться при связывании с надлежащими регуляторными элементами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления «конструкция» может включать в себя конструкцию для клонирования и/или экспрессии и/или вирусную конструкцию (например конструкцию аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусную конструкцию, лентивирусную

конструкцию или ретровирусную конструкцию).

[0038] Консервативный: В рамках настоящего изобретения термин «консервативный» относится к случаям, описывающим консервативную аминокислотную замену, включая замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком имеющим группу R латеральной цепи с аналогичными химическими свойствами (например зарядом или гидрофобностью). В общем консервативная аминокислотная замена по существу не изменит функциональные свойства представляющего интерес белка, например, способность рецептора связываться с лигандом. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают: алифатические боковые цепи, такие как глицин (Gly, G), аланин (Ala, A), валин (Val, V), лейцин (Leu, L) и изолейцин (Ile, I); алифатические гидроксильные боковые цепи, такие как серин (Ser, S) и треонин (Thr, T); амидсодержащие боковые цепи, такие как аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q); ароматические боковые цепи, такие как фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y) и триптофан (Trp, W); основные боковые цепи, такие как лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) и гистидин (His, H); кислотные боковые цепи, такие как аспарагиновая кислота (Asp, D) и глутаминовая кислота (Glu, E); и серосодержащие боковые цепи, такие как цистеин (Cys, C) и метионин (Met, M). группы консервативных аминокислотных замен включают, например, валин/лейцин/изолейцин (Val/Leu/Ile, V/L/I), фенилаланин/тирозин (Phe/Tyr, F/Y), лизин/аргинин (Lys/Arg, K/R), аланин/валин (Ala/Val, A/V), глутамат/аспартат (Glu/Asp, E/D) и аспарагин/глутамин (Asn/Gln, N/Q). В некоторых вариантах осуществления консервативной аминокислотной заменой может быть замена любого нативного остатка в белке на аланин, как это используют, например, в аланин-сканирующем мутагенезе. В некоторых вариантах осуществления проводят консервативную замену, которая имеет положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al., 1992, Science 256:1443-1445, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой умеренно консервативную замену, причем замена имеет неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Специалисту в данной области понятно, что изменение (например замена, добавление, делеция и так далее) аминокислот, которые не являются консервативными, в одном и том же белке у разных видов, с меньшей вероятностью окажет влияние на функцию белка и, следовательно, для мутации нужно выбирать эти аминокислоты. Аминокислоты, которые являются консервативными в одном и том же белке у разных видов, не следует изменять (например удалять, добавлять, заменять и так далее), поскольку эти мутации с большей вероятностью приведут к изменению функции белка.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ		
Для аминокислоты	Код	Замена на

Аланин	A	D-ala, Gly, Aib, β -Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Аргинин	R	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Аспарагин	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Аспарагиновая Кислота	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Глутамин	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая Кислота	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
Изолейцин	I	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	L	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лизин	K	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Метионин	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4 или 5-фенилпролин, AdaA, AdaG, цис-3,4 или 5-фенилпролин, п.н.а, D-Bpa
Пролин	P	D-Pro, L-I-тиоазолидин-4-карбоновая кислота, D-or-L-1-оксазолидин-4-карбоновая кислота (Kauer, патент США № 4511390)
Серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
Треонин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), Val, D-Val
Тирозин	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Валин	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG

[0039] Контроль: В рамках настоящего изобретения термин «контроль» относится к понятному в данной области значению «контроля», являющегося стандартом, с которым сравнивают результаты. Обычно, контроль используют для повышения целостности экспериментов путем выделения переменных, чтобы сделать вывод о таких переменных. В

некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой реакцию или анализ, которые проводят одновременно с тестовой реакцией или анализом для получения средства сравнения. Например, в одном эксперименте применяют «тест» (то есть тестируемую переменную). Во втором эксперименте, «контрольном», тестируемую переменную не применяют. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исторический контроль (например, теста или анализа, выполненного ранее или количества или результата, которые были известны ранее). В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой или содержит распечатанную или иным образом сохраненную запись. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой положительный контроль. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой отрицательный контроль

[0040] Определение измерение, оценка, тестирование испытание и анализ: В рамках настоящего изобретения термины «определение», «измерение», «оценка», «тестирование», «испытание» и «анализ» можно использовать взаимозаменяемо для обозначения любой формы измерения и они включают в себя определение наличия элемента или его отсутствия. Эти термины включают количественные и/или качественные определения. Анализ может быть относительным или абсолютным. Например, в некоторых вариантах осуществления «анализом наличия» может быть определение количества чего-либо имеющегося и/или определение его наличия или отсутствия.

[0041] Сконструированный: В общем в рамках настоящего изобретения термин «сконструированный» относится к аспекту ручного манипулирования человеком. Например, клетка или организм считаются «сконструированными», если в результате манипулирования была изменена ее генетическая информация (например был введен новый генетический материал, не имевшийся ранее, например с помощью трансформации, скрещивания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции или другого механизма, или ранее имевшийся генетический материал был изменен или удален, например за счет мутации с заменой или делецией или с помощью протоколов скрещивания). Согласно общепринятой практике и как понятно специалистам в данной области, потомство сконструированного полинуклеотида или клетки обычно также называют «сконструированным», даже если фактическая манипуляция была выполнена на предшествующем объекте.

[0042] Вспомогательное средство: В рамках настоящего изобретения термин «вспомогательное средство» относится к неактивному (например не терапевтическому) средству, которое может быть включено в фармацевтическую композицию, например для обеспечения или содействия нужной консистенции или стабилизирующему эффекту. В некоторых вариантах осуществления приемлемые фармацевтические вспомогательные средства могут включать в себя, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное.

[0043] Экспрессия: В рамках настоящего изобретения термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к выработке любого генного продукта (например транскрипта, например мРНК, например полипептида и так далее) из последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления генным продуктом может быть транскрипт. В некоторых вариантах осуществления генным продуктом может быть полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты включает один или несколько элементов из следующих: (1) выработка матрицы РНК из последовательности ДНК (например посредством транскрипции); (2) процессинг транскрипта РНК (например посредством сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп и/или образования 3'-конца); (3) трансляция РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционная модификация полипептида или белка.

[0044] Фланкированный: В рамках настоящего изобретения термин «фланкированный» относится к положению по сравнению с концами эталонного объекта. Более конкретно, что касается эталонной последовательности (последовательностей) нуклеиновой кислоты, «фланкированный» относится к наличию последовательностей перед и после эталонной последовательности (последовательностей) нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах фланкированная эталонная последовательность нуклеиновой кислоты имеет первую последовательность или ряд нуклеотидных остатков, расположенных рядом с 5'-концом эталонной нуклеиновой кислоты, и вторую последовательность или ряд нуклеотидных остатков, расположенных рядом с 3'-концом эталонной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах расположенные перед и/или после фланкирующие последовательности находятся непосредственно рядом с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах имеются промежуточные нуклеиновые кислоты между расположенными перед и/или после фланкирующими последовательностями и эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0045] Функциональный: В рамках настоящего изобретения термин «функциональный» описывает нечто, что существует в форме, в которой оно проявляет свойство и/или активность, которая его характеризует. Например, в некоторых аспектах «функциональный» биологический молекула is биологический молекула в форме, в котором it проявляет свойство и/или активность, которая его характеризует. В некоторых таких аспектах функциональную биологическую молекулу характеризуют по сравнению с другой биологической молекулой, которая не является функциональной, так как «нефункциональный» вариант не проявляет такое же или эквивалентное свойство и/или активность, что и «функциональная» молекула. биологическая молекула может иметь одну функцию, две функции (то есть бифункциональная) или много функций (то есть многофункциональная).

[0046] Ген: В рамках настоящего изобретения термин «ген» относится к последовательности ДНК в хромосоме, которая кодирует генный продукт (например

продукт РНК, например продукт полипептид). В некоторых вариантах осуществления ген содержит кодирующую последовательность (то есть последовательность, которая кодирует конкретный продукт). В некоторых вариантах осуществления ген содержит не кодирующую последовательность. В некоторых конкретных вариантах осуществления ген может содержать как кодирующую (например экзонную), так и не кодирующую (например интронную) последовательность. В некоторых вариантах осуществления ген может содержать одну или несколько регуляторных последовательностей (например промоторы, энхансеры и так далее) и/или интронных последовательностей, которые, например, могут управлять или влиять на один или несколько аспектов экспрессии гена (например специфическая к типу клеток экспрессия, индуцибельная экспрессия и так далее). В рамках настоящего изобретения термин «ген» обычно относится к части нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид или его фрагмент; как будет понятно из контекста рядовым специалистам в данной области, термин может необязательно включать в себя регуляторные последовательности. Это определение не предназначено для исключения применения термина «ген» к блокам экспрессии, не кодирующим белок, но скорее, чтобы пояснить, что в рамках настоящего изобретения в большинстве случаев термин относится к кодирующей полипептид нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным, например вариант гена может кодировать полипептид, который функционирует не таким же образом или не функционирует совсем, по сравнению с геном дикого типа. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать транскрипт, который в некоторых вариантах осуществления может быть токсичным выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным и/или может быть токсичным выше порогового уровня.

[0047] Потеря слуха: В рамках настоящего изобретения термин «потеря слуха» может быть использован для частичной или общей неспособности живого организма слышать. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть приобретенной. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть наследственной. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть генетической. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть в результате заболевания или травмы (например физической травмы, лечения одним или несколькими средствами, приводящими к потере слуха и так далее). В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть вызвана одной или несколькими известными генетическими причинами и/или синдромами. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может иметь неизвестную этиологию. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть уменьшена или не уменьшена за счет применения слуховых аппаратов или других видов лечения.

[0048] Гетерологичный: В рамках настоящего изобретения термин «гетерологичный» может быть использован для ссылки на одну или несколько областей конкретной молекулы по сравнению с другой областью и/или другой молекулой. В

некоторых вариантах осуществления домены гетерологичных полипептидов относятся к тому, что домены полипептидов не встречаются в природе вместе (например в одном и том же полипептиде). Например, в белках слияния, получаемых человеком вручную, домен полипептида из одного полипептида может быть слит с доменом полипептида из другого полипептида. В такой белке слияние два домена полипептидов будут считаться «гетерологичными» относительно друг друга, так как они не встречаются в природе вместе.

[0049] Идентичность: В рамках настоящего изобретения термин «идентичность» относится к общему родству между полимерными молекулами, например между молекулами нуклеиновой кислоты (например молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептида. В некоторых вариантах осуществления считается, что полимерные молекулы «по существу идентичны» друг другу, если их последовательности идентичны по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. Расчет процентной идентичности двух последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептидов, например, можно проводить с помощью выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например для оптимального выравнивания в одну или обе из первой и второй последовательностей можно вводить гэпы, и неидентичные последовательности можно не учитывать для целей сравнения). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% длины эталонной последовательности; затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях. Когда положение в первой последовательности занято таким же остатком (например нуклеотидным или аминокислотным), что и соответствующее положение во второй последовательности, то две молекулы (то есть первая и вторая) являются идентичными в этом положении. Процентная идентичность между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для двух сравниваемых последовательностей, с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который нужно ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями можно выполнять с использованием математического алгоритма. Например, процентную идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Meyers и Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0). В некоторых вариантах осуществления в сравнениях последовательностей нуклеиновой кислоты, проводимых с помощью программы ALIGN, используют таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4.

[0050] Ингибирующая нуклеиновая кислота: В рамках настоящего изобретения термин «ингибирующая нуклеиновая кислота» относится к последовательности

нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизируется с геном-мишенью, включая ДНК или РНК-мишень (например мРНК-мишень (например генный продукт коннексин, например мРНК коннексина, например мРНК GJB2)). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию и/или активность гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой короткую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (миРНК), антисмысловый олигонуклеотид, направляющую РНК (gRNA) или рибозим. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота имеет длину от примерно 10 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов (например от примерно 10 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 16 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 14 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 12 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 16 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 14 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 26 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 26 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, примерно 28 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов или 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, которая нацелена на GJB2. В некоторых таких вариантах осуществления РНК, ингибирующая GJB2, специфически гибридизуется с мишенью на молекуле РНК, содержащей GJB2. В некоторых таких вариантах осуществления РНК, ингибирующая GJB2, содержит, например, ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой короткую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (миРНК), антисмысловый олигонуклеотид, направляющую РНК (gRNA) или рибозим. В некоторых вариантах осуществления гибридизация РНК, ингибирующей GJB2, уменьшает экспрессию генного продукта GJB2. В настоящем документе представлены иллюстративные последовательности ингибирующей РНК, приемлемые для ингибирования GJB2.

[0051] Улучшают, увеличивают, усиливают, ингибируют или уменьшают: В рамках настоящего изобретения термины «улучшают», «увеличивают», «усиливают», «ингибируют», «уменьшают» или их грамматические эквиваленты, указывают значения по сравнению с исходным измерением или другим эталонным измерением. В некоторых вариантах осуществления значение представляет собой статистически значимое отличие от исходного уровня или другого эталонного измерения. В некоторых вариантах осуществления подходящее эталонное измерение может представлять собой или включать измерение в конкретной системе (например у одного человека) в сравнимых в остальном условиях в отсутствие (например до и/или после) конкретного средства или лечения или в присутствии подходящего сопоставимого эталонного средства. В некоторых вариантах осуществления подходящее эталонное измерение представляет собой или включает измерение в сопоставимой системе, которая как известно или ожидается конкретным образом реагирует в присутствии соответствующего средства или лечения. В некоторых вариантах осуществления подходящим эталоном является отрицательный эталон; в некоторых вариантах осуществления подходящим эталоном является положительный эталон.

[0052] Нокдаун: В рамках настоящего изобретения термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии одного или нескольких генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота обеспечивает нокдаун. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома, описанная в настоящем документе, обеспечивает нокдаун.

[0053] Нокаут: В рамках настоящего изобретения термин «нокаут» относится к устранению экспрессии одного или нескольких генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома, описанная в настоящем документе, обеспечивает нокаут.

[0054] МикроРНК: В рамках настоящего изобретения термин «микроРНК» или «миРНК» относятся к классу биомолекул, участвующих в регулировании экспрессии гена. зрелой миРНК обычно является некодирующая РНК длиной 18-25 нуклеотидов, которая

регулирует экспрессию мРНК, содержащей последовательности, комплементарные миРНК. Известно, что эти малые молекулы РНК регулируют экспрессию гена путем регулирования стабильности и/или трансляции мРНК. В некоторых аспектах миРНК связывается с 3'-UTR мРНК-мишеней и подавляют трансляцию. МиРНК могут также связываться с мРНК-мишенями и опосредовать сайленсинг гена посредством пути РНКи. МиРНК могут также регулировать экспрессию гена, вызывая конденсацию хроматина.

[0055] В некоторых аспектах микроРНК имеет длину от примерно 10 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов (например от примерно 10 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 16 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 14 нуклеотидов, от примерно 10 нуклеотидов до примерно 12 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 16 нуклеотидов, от примерно 12 нуклеотидов до примерно 14 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 16 нуклеотидов до примерно 18 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 18 нуклеотидов до примерно 20 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 20 нуклеотидов до примерно 22 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 22 нуклеотидов до примерно 24 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, от примерно 24 нуклеотидов до примерно 26 нуклеотидов, от примерно 26 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов, от примерно 26 нуклеотидов до примерно 28 нуклеотидов, примерно 28 нуклеотидов до примерно 30 нуклеотидов или 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов).

[0056] Регуляторный сайт-мишень микроРНК: В рамках настоящего изобретения термин «регуляторный сайт-мишень микроРНК» или «miRTS» относится к последовательности, которая прямо взаимодействует с миРНК на транскрипте мРНК. Часто miRTS находится в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК, но также может находиться в кодирующей последовательности или в 5'-UTR. Необязательно, miRTS являются идеальными дополнениями миРНК, обычно имеющими только несколько оснований комплементарности с миРНК и часто содержащими одно или несколько несоответствий. miRTS может иметь любую последовательность, способную в достаточной степени связываться с миРНК, чтобы трансляция гена, с которой функционально связана miRTS, подавлялась механизмом сайленсинга миРНК, таким как индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC). В некоторых аспектах включение miRTS в конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид (например терапевтический полинуклеотид), может приводить к разложению терапевтического полинуклеотида после транскрипции. В некоторых аспектах включение miRTS в конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую полинуклеотид (например терапевтический полинуклеотид), может приводить к сниженной экспрессии терапевтического полинуклеотида в клетках, экспрессирующих миРНК.

[0057] Нуклеиновая кислота: В рамках настоящего изобретения термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое представляет собой или может быть включено в цепь олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое представляет собой или может быть включено в цепь олигонуклеотида посредством фосфодиэфирной связи. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к отдельному остатку нуклеиновой кислоты (например нуклеотиду и/или нуклеозиду); в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к цепи олигонуклеотида, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких натуральных остатков нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не использован фосфодиэфирный остов. Альтернативно или кроме того, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет одну или несколько фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирные связи. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких натуральных нуклеозидов (например аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин, уридин, дезоксиаденозин, дезокситимидин,

дезоксигуанозин и дезоксицитидин). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеозида (например 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирроло-пиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C-5 пропинилцитидин, C-5 пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодоуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксааденозин, 8-оксогуанозин, O(6)-метилгуанин, 2-тиоцитидин, метилированные основания, встроенные основания и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько модифицированных сахаров (например 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с натуральными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают с помощью одного или нескольких способов из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), воспроизведения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью одноцепочечной; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует или является комплементарным последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет ферментативную активность.

[0058] Функционально связанные: В рамках настоящего изобретения относится к сопоставлению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предполагаемым образом. Регуляторный элемент, «функционально связанный» с функциональным элементом, связан таким образом, чтобы обеспечить экспрессию и/или активность функционального элемента в условиях совместимых с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления «функционально связанные» регуляторные элементы являются смежными (например ковалентно связанными) с представляющими интерес кодирующими элементами; в некоторых вариантах осуществления регуляторные элементы действуют в положении транс к представляющему интерес функциональному элементу или от него, или расположены относительно него иным образом. В некоторых вариантах осуществления

«функционально связанные» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты имеет функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, например, функциональная связь может предусматривать регуляцию на уровне транскрипции. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом, а когда нужно, например, соединить две области, кодирующие белок, находятся в одной и той же рамке считывания.

[0059] Фармацевтическая композиция: В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активное средство составлено вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активное средство находится в количестве разовой дозы, подходящей для введения в терапевтической схеме, которая показывает статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена специально для введения в твердой или жидкой форме, включая композиции, предназначенные, например, для введения, например, инъекционной готовой формы, то есть, например, водного или неводного раствора или суспензии, или жидкокапельной, предназначенной для введения в слуховой проход. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для введения посредством инъекции либо в конкретный орган, либо в компартмент, например, прямо в ухо или системно, например внутривенно. В некоторых вариантах осуществления готовая форма может представлять собой или включать жидкие лекарственные формы (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, болюсы, порошки, гранулы, пасты, капсулы, порошки и так далее. В некоторых вариантах осуществления активное средство может представлять собой или включать выделенное, очищенное или чистое соединение.

[0060] Фармацевтически приемлемый: В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый», который, например, может быть использован для ссылки на носитель, разбавитель или вспомогательное средство используемое для составления фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, означает, что носитель, разбавитель или вспомогательное средство совместимо с другими ингредиентами композиции и не вредно для ее реципиента.

[0061] Фармацевтически приемлемый носитель: В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или переносчик, например, жидкий или твердый наполнитель,

разбавитель, вспомогательное средство или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами готовой формы и не вредить пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут выступать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные средства, такие как масло какао и воск для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; буферные растворы pH; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических готовых формах.

[0062] Полиаденилирование: В рамках настоящего изобретения «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилилового фрагмента или его модифицированного варианта, с молекулой матричной РНК. В эукариотических организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) полиаденилированы на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000), добавленную к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост может быть добавлен к транскриптам, которые содержат специфическую последовательность, сигнал полиаденилирования или «последовательность поли(А)». Поли(А)-хвост и связанные с ним белки помогают защищать мРНК от разложения экзонуклеазами. Полиаденилирование может влиять на терминацию транскрипции, экспорт мРНК из ядра и трансляцию. Обычно полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, но дополнительно может также происходить позже в цитоплазме. После завершения транскрипции цепь мРНК может быть расщеплена под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления может характеризоваться наличием последовательности оснований AAUAAA рядом с сайтом расщепления. После расщепления мРНК остатки аденозина могут быть добавлены к свободному 3'-концу на сайте расщепления. В рамках настоящего изобретения «последовательность поли(А)» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и присоединение ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

[0063] Полипептид: В рамках настоящего изобретения термин «полипептид»

относится к любой полимерной цепи остатков (например аминокислот), которые обычно связаны пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая является сконструированной, потому что она разработана и/или получена за счет действий человека вручную. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать или состоять из натуральных аминокислот, ненатуральных аминокислот или и того и другого. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать одну или несколько пendants групп или другие модификации, например модификацию или присоединение к боковым цепям одной или нескольких аминокислот, на N-конце полипептида, на C-конце полипептида или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие пendants группы или модификации могут представлять собой ацетилирование, амидирование, липидизацию, метилирование, пэгирование и так далее, включая их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или и то и другое, и могут содержать любую из множества модификаций или аналогов аминокислот, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления полезные модификации могут представлять собой или включать, например, концевое ацетилирование, амидирование, метилирование и так далее. В некоторых вариантах осуществления белок может содержать натуральные аминокислоты, ненатуральные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин «пептид» обычно используют для обозначения полипептида, имеющего длину менее примерно 100 аминокислот, менее примерно 50 аминокислот, менее 20 аминокислот или менее 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой антитела, фрагменты антител, их биологически активные части и/или их характеристические части.

[0064] Полинуклеотид: В рамках настоящего изобретения термин «полинуклеотид» относится к любой полимерной цепи нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких остатков натуральной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог полинуклеотида отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не использован фосфодиэфирный остов. Альтернативно или кроме того, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет одну или несколько фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирные связи. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких натуральных нуклеозидов (например аденозин, тимидин, гуанозин, цитидин,

уридин, дезоксиаденозин, дезокситимидин, дезоксигуанозин и дезоксицитидин). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеозида (например 2-аминоаденозин, 2-тиотимидин, инозин, пирроло-пиримидин, 3-метиладенозин, 5-метилцитидин, C-5 пропинилцитидин, C-5 пропинилуридин, 2-аминоаденозин, C5-бромурин, C5-фторуридин, C5-йодоуридин, C5-пропинилуридин, C5-пропинилцитидин, C5-метилцитидин, 2-аминоаденозин, 7-дезааденозин, 7-дезагуанозин, 8-оксоаденозин, 8-оксогуанозин, 0(6)-метилгуанин, 2-тиоцитидин, метилированные основания, встроенные основания и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит один или несколько модифицированных сахаров (например 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с натуральными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид получают с помощью одного или нескольких способов из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), воспроизведения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является частично или полностью одноцепочечным; в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является частично или полностью двухцепочечным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует полипептид, или является дополнением последовательности, которая его кодирует. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет ферментативную активность.

[0065] Промотор: В рамках настоящего изобретения термин «промотор» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, функцией которой является регулирование транскрипции одной или нескольких кодирующих последовательностей (например гена или трансгена, например, кодирующего терапевтический полипептид), расположенных впереди относительно направления транскрипции сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности. В некоторых аспектах промотор структурно идентифицирован наличием сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции или другой последовательности ДНК (например сайта связывания фактора транскрипции, сайта связывания белка-репрессора и/или активатора или других последовательностей нуклеотидов, которые действуют прямо или непрямо для регулирования количества транскрипции из промотора). В некоторых аспектах промотор

может содержать природную промоторную последовательность, ее функциональный фрагмент или мутант природной промоторной последовательности или ее функционального фрагмента.

[0066] Белок: В рамках настоящего изобретения термин «белок» относится к полипептиду (то есть к нити по меньшей мере из двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут содержать фрагменты, не являющиеся аминокислотами (например, могут быть гликопротеины, протеогликаны и так далее), и/или могут быть процессированы или модифицированы иным образом. Рядовым специалистам в данной области понятно, что «белок» может представлять собой полную полипептидную цепь, вырабатываемую клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее) или может представлять собой его характеристическую часть. Рядовым специалистам понятно, что иногда белок может содержать более одной полипептидной цепи, например связанной одной или несколькими дисульфидными связями или связанными другими средствами.

[0067] Рекомбинант: В рамках настоящего изобретения термин «рекомбинант» предназначен для обозначения полипептидов, которые разработаны, сконструированы, получены, экспрессированы, созданы, изготовлены и/или выделены с помощью таких рекомбинантных средств, как полипептиды, экспрессируемые с использованием рекомбинантной конструкции экспрессии, трансфицированной в клетку-хозяин; полипептиды, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных полипептидов человека; полипептиды, выделенные у животного (например мыши, кролика, овцы, рыбы и так далее), которое является трансгенным или подверглось иной манипуляции для экспрессии гена или генов или компонентов генов, которые кодируют и/или направляют экспрессию полипептида или одного или нескольких его компонентов, частей, элементов или доменов; и/или полипептиды, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают сплайсинг или лигирование выбранных элементов последовательности нуклеиновой кислоты друг с другом, химический синтез выбранных элементов последовательности и/или генерирование иным образом нуклеиновой кислоты, которая кодирует и/или направляет экспрессию полипептида или одного или нескольких его компонентов, частей, элементов или доменов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности разработаны *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности являются результатом мутагенеза (например *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности, например из природного или синтетического источника, такого как, например, в зародышевой линии представляющего интерес исходного организма (например человека, мыши и так далее).

[0068] Эталон: В рамках настоящего изобретения термин «эталон» описывает стандарт или контроль, с которым проводят сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления представляюще интерес средство, животное, человек, популяция, образец,

последовательность или значение сравнивают с эталоном или контрольным средством, животным, человеком, популяцией, образцом, последовательностью или значением. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль тестируют и/или определяют по существу одновременно с представляющим интерес тестированием или определением. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль представляет собой исторический эталон или контроль, необязательно воплощенный в материальном носителе. Обычно, как будет понятно специалистам в данной области, эталон или контроль определяют или характеризуют в условиях или обстоятельствах, сравнимых с оцениваемыми. Специалистам в данной области будет понятно, когда имеется достаточное сходство, чтобы подтвердить уверенность и/или сравнение с конкретным возможным эталоном или контролем. В некоторых вариантах осуществления эталоном является отрицательный контрольный эталон; в некоторых вариантах осуществления эталоном является положительный контрольный эталон.

[0069] Регуляторный элемент: В рамках настоящего изобретения термин «регуляторный элемент» или «регуляторная последовательность» относится к некодирующим областям ДНК, которые каким-то образом регулируют экспрессию одного или нескольких конкретных генов. В некоторых вариантах осуществления такие гены расположены напротив или «по соседству» с данным регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления такие гены расположены достаточно далеко от данного регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент ухудшает или усиливает транскрипцию одного или нескольких генов. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в положении цис относительно регулируемого гена. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в положении транс относительно регулируемого гена. Например, в некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию генного продукта, функционально связанного с регуляторной последовательностью. В некоторых таких вариантах осуществления этой последовательностью может быть энхансерная последовательность и другие регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию генного продукта.

[0070] Образец: В рамках настоящего изобретения термин «образец» обычно относится к аликвоте материала, полученной или произведенной из представляющего интерес источника. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой биологический источник или источник из окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник может представлять собой или включать клетку или организм, такой как микроорганизм (например вирус), растение или животное (например человека). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой или содержит биологическую ткань или текучую среду. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или текучая среда может представлять собой или включать

околоплодную жидкость, водянистую влагу, асцит, желчь, костный мозг, кровь, грудное молоко, спинномозговую жидкость, ушную серу, хилус, chime, эякулят, эндолимфу, экссудат, фекалии, желудочную кислоту, желудочный сок, лимфу, слизь, перикардальную жидкость, перилимфу, перитонеальную жидкость, плевральная жидкость, гной, выделения слизистых оболочек, слюну, кожное сало, сперму, сыворотку, смегму, мокроту, синовиальную жидкость, пот, слезы, мочу, вагинальные выделения, жидкость стекловидного тела, рвотные массы и/или их комбинации или компонент (компоненты). В некоторых вариантах осуществления биологическая текучая среда может представлять собой или включать внутриклеточную жидкость, внеклеточную жидкость, внутрисосудистую жидкость (плазму крови), интерстициальную жидкость, лимфатическую жидкость и/или трансселлюлярную жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая текучая среда может представлять собой или включать экссудат растения. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или образец может быть получен, например, путем аспирации, биопсии (например тонкоигольной биопсии или биопсии ткани), мазка (например орального, носового, кожного или вагинального мазка), соскоба, хирургического вмешательства, промывания или лаважа (например бронхоальвеолярного, протокового, назального, глазного, орального, маточного, вагинального или другого промывания или лаважа). В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой или содержит клетки, полученные у человека. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец», полученный прямо из представляющего интерес источника с помощью любого подходящего средства. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно из контекста, термин «образец» относится к препарату, который получен посредством обработки (например посредством удаления одного или нескольких компонентов и/или посредством добавления одного или нескольких средств в) первичный образец. Например, фильтрация с использованием полупроницаемой мембраны. Такой «обработанный образец» может содержать, например, нуклеиновые кислоты или белки, экстрактированные из образца или полученные посредством воздействия на первичный образец одним или несколькими методами, такими как амплификация или обратная транскрипция нуклеиновой кислоты, выделение и/или очистка определенных компонентов и так далее.

[0071] Выборочная экспрессия: В рамках настоящего изобретения термин «выборочная экспрессия» или «выборочно экспрессирует» относится к экспрессии представляющих интерес кодирующей последовательности, гена, транскрипта или полинуклеотида (например терапевтического полинуклеотида) преимущественно в некоторых определенных типах клеток (например в клетках внутреннего уха, например в поддерживающих клетках внутреннего уха).

[0072] Субъект: В рамках настоящего изобретения термин «субъект» обозначает организм, обычно млекопитающее (например человека, в некоторых вариантах осуществления включая пренатальные человеческие формы). В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется соответствующее заболевание, нарушение или

состояние. В некоторых вариантах осуществления субъект восприимчив к заболеванию, нарушению или состоянию. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется один или несколько симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не проявляется какой-либо симптом или характеристика заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой лицо с одним или несколькими признаками, характерными для предрасположенности или риска заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом. В некоторых вариантах осуществления субъектом является индивидум, которому поставлен диагноз, и/или проводят и/или проводили терапию.

[0073] По существу: В рамках настоящего изобретения термин «по существу» относится к качественному состоянию проявления общего или почти общего размера или степени представляющей интерес характеристики или свойства. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или доходят до завершения или достигают или избегают абсолютного результата. Таким образом, термин «по существу» использован в настоящем документе для отражения потенциальной неполноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

[0074] Поддерживающая клетка: В рамках настоящего изобретения термин «поддерживающая клетка», «опорная клетка», «поддерживающая клетка внутреннего уха» или «опорная клетка внутреннего уха» относится к клеткам внутреннего уха, которые сохраняют структуру внутреннего уха и сохраняют среду нейроэпителия внутреннего уха. В некоторых аспектах поддерживающие клетки внутреннего уха включают без ограничения внутренние фаланговые клетки/пограничные клетки (IPhC), внутренние столбовые клетки (IPC), наружные столбовые клетки (OPC), 1 и 2 ряды клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряд клеток Дейтерса (DC3), клетки Гензена (Hes), клетки Клаудиуса/клетки наружной борозды (CC/OSC), интердентальные клетки (Idc), клетки внутренней борозды (ISC), клетки органа Келликера (KO), клетки большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90), фибробласты и другие клетки латеральной стенки.

[0075] Лечение: В рамках настоящего изобретения термин «лечение» (также «лечить» или «при лечении») относится к любому применению терапии, которая частично или полностью облегчает, улучшает, устраняет, обращает вспять, ослабляет, ингибирует, задерживает наступление, уменьшает тяжесть и/или уменьшает частоту возникновения одного или нескольких симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение можно применять к субъекту, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния, и/или к субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния. Альтернативно или кроме того, такое лечение можно применять к субъекту, у которого проявляются один или несколько

установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение можно применять к субъекту, у которого было диагностировано соответствующее заболевание, нарушение и/или состояние. В некоторых вариантах осуществления лечение можно применять к субъекту, о котором известно, что у него имеется один или несколько факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития данного заболевания, нарушения и/или состояния.

[0076] Вариант: В рамках настоящего изобретения термин «вариант» относится к варианту чего-либо, например последовательности гена, который отличается каким-то образом от другого варианта. Для определения, является ли это вариантом, обычно выбирают эталонный вариант, и вариант отличается от этого эталонного варианта. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь такой же или иной (например повышенный или пониженный) уровень активности или функциональности чем у последовательности дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант может иметь улучшенную функциональность по сравнению с последовательностью дикого типа, если он, например, оптимизирован по кодонам для противодействия разложению, например посредством ингибирующей нуклеиновой кислоты, например миРНК. Такой вариант называется в настоящем документе вариантом с приобретением функции. В некоторых вариантах осуществления вариант характеризуется уменьшением или устранением активности или функциональности, или изменением активности, что приводит к отрицательному результату (например к повышению электрической активности, приводящему к хронической деполяризации, которая приводит к гибели клеток). Такой вариант в настоящем документе называется вариантом с потерей функции. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательность гена GJB2 является последовательностью дикого типа, которая кодирует функциональный белок и имеется у большинства представителей видов с геномами, содержащими ген GJB2. В некоторых таких вариантах осуществления вариантом с приобретением функции может быть последовательность гена GJB2, которая содержит одно или несколько нуклеотидных отличий по сравнению с последовательностью гена GJB2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариантом с приобретением функции является кодон-оптимизированная последовательность, которая кодирует транскрипт или полипептид, которые могут иметь улучшенные свойства (например меньшую предрасположенность к разложению, например меньшую предрасположенность к опосредованному миРНК разложению), чем у соответствующего варианта дикого типа (например без оптимизации по кодонам). В некоторых вариантах осуществления вариант с потерей функции имеет одно или несколько изменений, которые приводят к какому-то дефекту транскрипта или полипептида (например сниженной функции, отсутствию функции) по сравнению с транскриптом и/или полипептидом дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления мутация в последовательности GJB2 приводит к нефункциональному или иным образом дефективному белку коннексину 26 (Cx26).

Подробное описание некоторых вариантов осуществления

Потеря слуха

[0077] Как правило ухо можно описать, как включающее в себя: наружное ухо, среднее ухо, внутреннее ухо, слуховой (акустический) нерв и слуховую систему (которая обрабатывает звук по мере его прохождения из уха в головной мозг). Помимо обнаружения звука уши также помогают сохранять равновесие. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нарушения внутреннего уха могут вызывать потерю слуха, шум в ушах, головокружение, нарушение равновесия или их комбинации.

[0078] Потеря слуха может быть результатом генетических факторов, экологических факторов или комбинации генетических и экологических факторов. Примерно половина всех людей, у которых есть шум в ушах--фантомные шумы в их слуховой системе (звон, жужжание, чириканье, гудение или биение)--также имеют повышенную чувствительность/пониженную переносимость к определенным звуковым частотам и диапазонам громкости, известным как гиперacusia. Специалистам в данной области известны различные несиндромальные и связанные с синдромом потери слуха (например DFNB1 и DFNA3. Или синдром Барта-Памфри, иглистый ихтиоз с глухотой (HID), ладонно-подошвенная кератодермия с глухотой, синдром кератита-ихтиоза-глухоты (KID) и синдром Вохвинкеля, соответственно). Экологические причины ухудшения или потери слуха могут включать, например, некоторые лекарства, определенные инфекции до или после рождения и/или воздействие громкого шума в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть вызвана шумом, ототоксичными средствами, пресбиакузисом, заболеванием, инфекцией или раком, которые поражают определенные части уха. В некоторых вариантах осуществления ишемическое повреждение может вызывать потерю слуха посредством патофизиологических механизмов. В некоторых вариантах осуществления быть причиной или способствовать потере слуха могут внутренние аномалии, такие как врожденные мутации генов, играющих важную роль в анатомии или физиологии улитки, или генетические или анатомические изменения в поддерживающих и/или волосковых клетках.

[0079] Потеря слуха и/или глухота являются одним из наиболее распространенных сенсорных дефицитов у человека и могут возникать по многим причинам. В некоторых вариантах осуществления субъект может родиться с потерей слуха или без слуха, в то время как другие могут медленно терять слух с течением времени. Приблизительно 36 миллионов взрослых американцев сообщают о той или иной степени потери слуха, а каждый третий человек старше 60 лет и половина людей старше 85 лет испытывают потерю слуха. Приблизительно 1,5 из 1000 детей рождаются с сильной потерей слуха, а еще от двух до трех из 1000 детей рождаются с частичной потерей слуха (Smith et al., 2005, Lancet 365:879-890, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Более, чем половине этих случаев приписывают генетическую основу (Di Domenico, et al., 2011, J. Cell. Physiol. 226:2494-2499, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

[0080] Лечение потери слуха в настоящее время состоит из усиления слуха при потере слуха от легкой до тяжелой степени и кохлеарной имплантации при потере слуха от тяжелой до глубокой степени (Kral и O'Donoghue, 2010, N. Engl. J. Med. 363:1438-1450, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Недавние исследования в этой области были сосредоточены на регенерации волосковых клеток улитки, применимой к наиболее распространенным формам потери слуха, включая пресбиакузис, шумовое повреждение, инфекцию и ототоксичность. Сохраняется потребность в эффективных методах лечения, таких как генная терапия, которые могут устранить и/или смягчить источник проблемы со слухом (см., например, WO 2018/039375, WO 2019/165292 и поданную заявку PCT US 2019/060328, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

[0081] В некоторых вариантах осуществления несиндромальная потеря слуха и/или глухота не связана с другими признаками и симптомами. В некоторых вариантах осуществления синдромальная потеря слуха и/или глухота возникают в сочетании с аномалиями в других частях тела. Приблизительно от 70 до 80 процентов случаев генетической потери слуха и/или глухоты являются несиндромальными; остальные случаи часто вызваны специфическими генетическими синдромами. Несиндромальная глухота и/или потеря слуха могут иметь разные типы наследования и могут возникать в любом возрасте. Типы несиндромальной глухоты и/или потери слуха обычно называют в соответствии с характером их наследования. Например, аутосомно-доминантные формы обозначают DFNA, аутосомно-рецессивные формы обозначают DFNB, а формы, сцепленные с X-хромосомой, обозначают DFN. Каждый тип также нумеруют в том порядке, в котором он был впервые описан. Например, DFNA1 был первым описанным аутосомно-доминантным типом несиндромальной глухоты. От 75 до 80 проценто генетически обусловленных случаев потери слуха и/или глухоты наследуются по аутосомно-рецессивному типу, что означает, что обе копии гена в каждой клетке имеют мутации. Обычно каждый родитель человека с аутосомно-рецессивной потерей слуха и/или глухотой является носителем одной копии мутантного гена, но не страдает этой формой потери слуха. Еще от 20 до 25 процентов случаев несиндромальной потери слуха и/или глухоты являются аутосомно-доминантными, что означает, что одной копии измененного гена в каждой клетке достаточно, чтобы привести к глухоте и/или потере слуха. Люди с аутосомно-доминантной глухотой и/или потерей слуха чаще всего наследуют измененную копию гена от родителя, который является глухим и/или имеет потерю слуха. От 1 до 2 процентов случаев глухоты и/или потери слуха демонстрируют X-сцепленный тип наследования, что означает, что мутантный ген, ответственный за состояние, расположен на X-хромосоме (одной из двух половых хромосом). У мужчин с X-сцепленной несиндромальной потерей слуха и/или глухотой, как правило, развивается более тяжелая потеря слуха в более раннем возрасте, чем у женщин, которые наследуют копию той же мутации гена. Характерной чертой X-сцепленного наследования является то, что отцы не могут передать X-сцепленные признаки своим сыновьям. Митохондриальная

несиндромальная глухота, возникающая в результате изменений в митохондриальной ДНК, в США встречается менее чем в одном проценте случаев. Измененная митохондриальная ДНК передается от матери всем ее сыновьям и дочерям. Этот тип глухоты не передается по наследству от отцов. Причины синдромальной и несиндромальной глухоты и/или потери слуха сложны. Исследователи выявили более 30 генов, изменение которых связано с синдромальной и/или несиндромальной глухотой и/или потерей слуха; однако некоторые из этих генов не были полностью охарактеризованы. Различные мутации в одном и том же гене могут быть связаны с различными типами глухоты и/или потери слуха, а некоторые гены связаны как с синдромальной, так и с несиндромальной глухотой и/или потерей слуха.

[0082] В некоторых вариантах осуществления глухота и/или потеря слуха могут быть кондуктивными (возникающими в результате поражения слухового прохода или среднего уха), нейросенсорными (возникающими в результате поражения внутреннего уха или слухового нерва) или смешанными. В некоторых вариантах осуществления несиндромальная глухота и/или потеря слуха связаны с постоянной потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота). В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная потеря слуха может быть связана с плохой функцией волосковых клеток. В некоторых вариантах осуществления сенсоневральные нарушения слуха затрагивают восьмой черепной нерв (преддверно-улитковый нерв) или слуховые отделы головного мозга. В некоторых таких вариантах затрагиваются только слуховые центры головного мозга. В такой ситуации может возникнуть корковая глухота, когда звуки можно слышать при нормальных пороговых значениях, но качество воспринимаемого звука настолько низкое, что речь нельзя понять. Потеря слуха, возникающая в результате изменений в среднем ухе, называется кондуктивной потерей слуха. Некоторые формы несиндромальной глухоты и/или потери слуха связаны с изменениями как внутреннего, так и среднего уха, что называется смешанной потерей слуха. Потеря слуха и/или глухота, которая присутствует до того, как ребенок научится говорить, может быть классифицирована как доречевая или врожденная. Потеря слуха и/или глухота, возникающая после развития речи, может быть классифицирована как постлингвальная. Большинство аутосомно-рецессивных локусов, связанных с синдромальной или несиндромальной потерей слуха, вызывают доречевую потерю слуха от тяжелой до глубокой степени.

[0083] Как известно специалистам в данной области, волосковые клетки являются сенсорными рецепторами как для слуховой, так и для вестибулярной систем ушей позвоночных. Волосковые клетки обнаруживают движение в окружающей среде, а у млекопитающих волосковые клетки расположены в улитке уха, в кортиевом органе. Известно, что уши млекопитающих имеют два типа волосковых клеток - внутренние волосковые клетки и наружные волосковые клетки. Наружные волосковые клетки могут усиливать звуковые частоты низкого уровня либо за счет механического движения пучков волосковых клеток, либо за счет движения с электрическим возбуждением сомы волосковых клеток. Внутренние волосковые клетки преобразуют колебания улитковой

жидкости в электрические сигналы, которые слуховой нерв передает в мозг. В некоторых вариантах осуществления волосковые клетки могут быть аномальными при рождении или повреждаться в течение жизни человека. В некоторых вариантах осуществления наружные волосковые клетки могут регенерировать. В некоторых вариантах осуществления внутренние волосковые клетки не способны к регенерации после болезни или травмы. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная потеря слуха обусловлена аномалиями волосковых клеток.

[0084] Как известно специалистам в данной области, волосковые клетки не встречаются изолированно, и их функцию поддерживает широкое разнообразие клеток, которые в совокупности можно называть поддерживающими клетками. Поддерживающие клетки могут выполнять многочисленные функции и включать ряд типов клеток, включая без ограничения клетки Гензена, клетки Дейтерса, столбовые клетки, клетки Клавдия, внутренние фаланговые клетки и пограничные клетки. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная потеря слуха возникает из-за аномалий в поддерживающих клетках. В некоторых вариантах осуществления поддерживающие клетки могут быть аномальными при рождении или повреждаться в течение жизни человека. В некоторых вариантах осуществления поддерживающие клетки могут регенерировать. В некоторых вариантах осуществления некоторые поддерживающие клетки могут быть неспособны к регенерации.

Ген щелевых контактов Бета-2 (GJB2)

[0085] Ген GJB2 является высококонсервативным во всем классе млекопитающих и кодирует коннексин 26 (Cx26) (также называемый белком бета-2 щелевого контакта (GJB2)). коннексин 26 является членом семейства белков щелевых контактов, которое также известно как семейство коннексинов. Белки щелевых контактов являются специализированными белками, участвующими во внутриклеточных связях. Мутации гена GJB2 человека связаны с потерей слуха и глухотой (Amorini et al., *Ann. Hum. Genet.* 79(5):341-349, 2015; Qing et al., *Genet. Test Mol. Biomarkers* 19(1):52-58, 2015).

[0086] Ген GJB2 человека расположен на хромосоме 13q12. Он имеет две транскрипционные изоформы, начинающиеся с альтернативных сайтов начала транскрипции, каждая из которых содержит два экзона и один интрон, включающий в себя в общей сложности примерно 5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) (примерно 5469 или 4675 нуклеотидов соответственно) (NCBI Gene ID 2706, эталонная последовательность NCBI: NG_008358.1). Обе изоформы мРНК GJB2 человека содержат второй экзон, который полностью кодирует полноразмерный коннексин 26 в экзоне два. Эта кодирующая последовательность составляет примерно 681 нуклеотид и кодирует коннексин 26 длиной 226 аминокислот.

[0087] Мономер коннексина 26 содержит четыре трансмембранные спирали, связанные двумя внеклеточными петлями и одной более короткой внутриклеточной петлей, с N- и C-концами на цитозольной стороне плазматической мембраны. Щелевые контакты между клетками могут образовываться гомомерно и/или гетеромерно. Было показано, что

коннексин 26 образует функциональные гомомерные каналы, а также функциональные гетеромерные каналы по меньшей мере с коннексином 30, коннексином 32, коннексином 46 и коннексином 50. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная потеря слуха, связанная с геном GJB2 (например несиндромальная или синдромальная) может быть обусловлена сложными гетерозиготными мутациями в GJB2 и в альтернативном гене, кодирующем белок коннексин. Щелевые контакты, созданные коннексином 26, транспортируют ионы калия и некоторые другие небольшие молекулы через клетки. коннексин 26 помогает поддерживать правильный уровень внутриклеточных ионов калия и необходим для созревания определенных клеток улитки.

[0088] Ген GJB2 человека экспрессируется в ряде тканей, но известно, что он участвует в важных функциях клеточного гомеостаза в эпидермисе и внутреннем ухе. Во внутреннем ухе коннексин 26 синтезируется всеми поддерживающими типами клеток кортиева органа, включая внутренние и наружные столбовые клетки, корневые клетки, интердентальные клетки, фиброциты подлежащей соединительной ткани, а также базальные и промежуточные клетки сосудистой полоски. Кроме того, известно, что коннексин 26 присутствует в мезенхимальных клетках латеральной стенки и нейронах 1 типа в спиральном ганглии.

[0089] Ген GJB2 человека имеет определенный базальный промотор длиной 128 п.н. Непосредственно перед каноническим первым экзоном в наиболее распространенной изоформе. Эта последовательность содержит блок ТАТА и два блока GC, которые, как известно, связаны с TF Sp1 и Sp3.

[0090] Существует более 200 определенных мутаций GJB2, которые демонстрируют некоторый уровень патогенности, и различные мутации гена GJB2 связаны с потерей слуха (например несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или синдромальная нейросенсорная потеря слуха). Например, аллель c.35delG был обнаружен у 65,5% пациентов из Восточной Сицилии (Amorini et al., *Ann. Hum. Genet.* 79(5):341-349, 2015). Дополнительные иллюстративные мутации гена GJB2, обнаруженные у субъектов с несиндромальной нейросенсорной потерей слуха или синдромальной нейросенсорной потерей слуха, и способы секвенирования нуклеиновой кислоты, кодирующей GJB2, описаны, например, в Snoeckx et al., *Am. J. Hum. Genet* 77: 945-957, 2005; Welch et al., *Am. J. Med. Genet A* 143: 1567- 1573, 2007; Zelante et al., *Hum. Mol. Genet.* 6:1605-1609, 1997; и Tsukada et al., *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. 2015, Vol. 124(5S) 61S-76S, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Способы обнаружения мутаций гена хорошо известны в данной области. Неограничивающие примеры таких способов включают: полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR), PCR, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование следующего поколения, Саузерн-блоттинг и Нозерн-блоттинг.

[0091] Многочисленные болезненные состояния, связанные с нейросенсорной потерей слуха с несиндромальными или синдромальными проявлениями, были связаны со специфическими мутациями гена GJB2 человека (см. Nickel & Forge, *Curr Opin Otolaryngol*

Head Neck Surg. 2008 Oct; 16(5):452-7, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Мутации гена GJB2 человека, которые приводят к синдромальной или несиндромальной потере слуха, варьируются от больших делеций, которые удаляют либо весь ген GJB2, либо регуляторные области гена GJB2, до сотен небольших изменений, включая нонсенс, миссенс, инсерционно-делеционные (приводящие к фазовому сдвигу) точечные мутации и точечные мутации сайта сплайсинга.

[0092] В некоторых вариантах осуществления мутации гена GJB2, такого как Gly59Ser и Asn52Lys, связаны с синдромом Барта-Памфри. Синдром, определяемый проявлениями утолщения кожи, бородавкообразных разрастаний и, как правило, врожденной сенсоневральной потерей слуха от умеренной до глубокой. В других вариантах осуществления мутации гена GJB2, такие как Asp50Asn, связаны с Hystrix-подобным ихтиозом с глухотой и синдромом кератита-ихтиоза-глухоты. Эти синдромы связаны с сухостью шелушащейся кожи, как правило, врожденной глубокой сенсоневральной потерей слуха, а при синдроме кератита-ихтиоза-глухоты - с дополнительным воспалением роговицы.

[0093] В некоторых вариантах осуществления миссенс-мутации гена GJB2 связаны с ладонно-подошвенной кератодермией и глухотой. При синдроме, связанном с утолщением кожи на ладонях рук и подошвах ног, а также нейросенсорной потерей слуха от легкой до глубокой степени, которая начинается в раннем детстве и со временем ухудшается, больные люди могут иметь особые проблемы с распознаванием высоких звуков. Хотя в других вариантах осуществления миссенс-мутации гена GJB2 связаны с синдромом Вохвинкеля, синдромом, связанным с кожными аномалиями (например с толстыми полосами фиброзной ткани вокруг пальцев рук и ног, которые могут нарушить кровообращение в пальцах и привести к спонтанной ампутации) и нейросенсорной потерей слуха.

[0094] В некоторых вариантах осуществления мутации гена GJB2 связаны с несиндромальной потерей слуха, которая может наследоваться либо доминантным (например DFNA3), либо рецессивным образом (DFNB1). В некоторых вариантах осуществления мутации гена потери функции GJB2 связаны с несиндромальным DFNB1, который наследуется по аутосомно-рецессивному типу и проявляется в виде потери слуха от легкой до глубокой, которая обычно является доречевой и не становится более серьезной с течением времени. Подсчитано, что DFNB1 присутствует примерно у 14 на каждые 100000 живых рожденных детей в США и EU5. Было высказано предположение, что за ранним, но не всегда врожденным началом нарушения слуха DFNB1 может последовать быстрое прогрессирование потери слуха. В целом варианты лечения патентов DFNB1 включают обучение, слуховые аппараты и кохлеарные импланты. Пациенты обычно не имеют дополнительных симптомов и живут с нормальной продолжительностью жизни. Подсчитано, что на DFNB1 приходится примерно 50% врожденной тяжелой или глубокой аутосомно-рецессивной несиндромальной потери слуха во многих развитых странах (например, в США, Франции, Великобритании и Австралии).

[0095] В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная потеря слуха из-за мутаций гена GJB2 наследуется аутосомно-доминантным образом как несиндромальный DFNA3. Эти мутации, как правило, представляют собой доминантные негативные миссенс-мутации, которые предотвращают образование необходимых функциональных щелевых контактов. Это болезненное состояние проявляется потерей слуха, которая может быть как доречевой, так и постлингвальной, от легкой до глубокой, которая со временем обычно становится более серьезной.

Полинуклеотиды GJB2

[0096] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлены полинуклеотиды, например полинуклеотиды, содержащие ген GJB2 или его характеристическую часть, а также композиции, содержащие такие полинуклеотиды, и способы использования таких полинуклеотидов и/или композиций.

[0097] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, содержащий ген GJB2 или его характеристическую часть, может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления ДНК может быть геномная ДНК или кДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК может быть мРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит экзоны и/или интроны гена GJB2.

[0098] В некоторых вариантах осуществления генный продукт экспрессируется из полинуклеотида, содержащего ген GJB2 или его характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления при экспрессии такого полинуклеотида можно использовать один или несколько регуляторных элементов (например промоторов, энхансеров, сайтов сплайсинга, сайтов полиаденилирования, сайтов инициации трансляции и так далее). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, представленный в настоящем документе, может содержать один или несколько регуляторных элементов.

[0099] В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 мышинных. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 приматов. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 человека. Иллюстративная последовательность кДНК, кодирующая GJB2 человека, представляет собой или содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Иллюстративная последовательность с нетранслируемыми областями сплайсированной кДНК GJB2 человека представляет собой или содержит последовательность SEQ ID NO: 3. Альтернативная иллюстративная последовательность с нетранслируемыми областями сплайсированной кДНК GJB2 человека с сайтом начала транскрипции представляет собой или содержит последовательность SEQ ID NO: 4. Иллюстративную последовательность геномной ДНК GJB2 человека можно найти в SEQ ID NO: 5.

Иллюстративная последовательность, кодирующая кДНК GJB2 человека (SEQ ID NO: 1)

ATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCA
CCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGT

TGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC
 TGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCC
 GGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGC
 ACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAA
 GAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCT
 CCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCT
 TCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGT
 GCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGA
 AGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGT
 CACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGT
 T

Иллюстративная последовательность, кодирующая кДНК GJB2 человека (SEQ ID NO: 2)

ATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCA
 CCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGT
 TGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC
 TGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCC
 GGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGC
 ACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAA
 GAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCT
 CCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCT
 TCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGT
 GCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGA
 AGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGT
 CACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGT
 TTAA

Иллюстративная последовательность сплайсированной кДНК изоформы 1 GJB2 человека, содержащей нетранслированные области (SEQ ID NO: 3)

GTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCG
 GCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCC
 AACGCCGAGACCCCCGCCCGGCCCGCCGCGCTTCCTCCCGACGCAGAGCAAACC
 GCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAAC
 AAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATT
 ATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGT
 CTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCAT
 CTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCT
 AGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGG
 GGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCG
 CATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTT
 CGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCG

GCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCG
 GCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCAT
 CCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCA
 AAAAAGCCAGTTTAAACGCATTGCCCAGTTGTTAGATTAAAGAAATAGACAGCATGAG
 AGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTAAC
 ACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAA
 CTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATT
 CTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTT
 AGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTT
 TCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGT
 TTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTG
 GTTCTTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCC
 TTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAACTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGA
 TGTAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTA
 ATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGT
 TATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAG
 CACCTAACACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGAT
 GGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAA
 ATACAGACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACAT
 CTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGT
 CGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAG
 GGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGT
 CTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGC
 CTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAA
 GGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTA
 TGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATT
 TTCCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTT
 AATGATATGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAACATT
 AAAATATAATCTCTATAATAA

**Иллюстративная последовательность сплайсированной кДНК изоформы X1
 GJB2 человека, содержащей нетранслированные области (SEQ ID NO: 4)**

TTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTC
 AGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGA
 ACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTTGGCCATGCACCTGG
 GACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCAGC
 CTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTG
 GCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTG
 TGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAA
 CGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCT
 GATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACA

TGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATC
 GAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACAC
 AAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTC
 ATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCC
 AACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTC
 ATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGC
 TAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAACGCATTGCCCAGTTGT
 TAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAA
 GGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTG
 AAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCT
 AAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTT
 AGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTGGTGTAAGGTACTTTCATATTT
 TAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAGCCAG
 GTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAAC
 TTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTC
 TAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAA
 ACTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATAACCATTATATGTT
 CCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTGCTACTAT
 GATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGG
 CTGTCTGTTGTATTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGT
 GAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAA
 ATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTAC
 CTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCA
 TCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCAT
 TTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTGCTTAAAAACA
 GATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTC
 AAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAAT
 AACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGG
 AAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCAAAAAATGGTACTC
 CACATATTTAGTGAGGGTAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGC
 ATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAATTTTGT
 AATGTATCAAATACATTTAAAACATTTAAAATATAATCTCTATAATAA

Иллюстративная последовательность геномной ДНК GJB2 человека (SEQ ID NO: 5)

GTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCG
 GCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCC
 AACGCCGAGACCCCCGCCCGGCCCGCCGCGCTTCTCTCCGACGCAGGTGAGCCC
 GCCGGCCCCGGAAGTGTCCCGGCCAGGAACCTGGCGCGGGGAGGGACCGCGAGACCC
 AGAGCGGTTGCCCGGCCGCGTGGGTCTCGGGGAACCGGGGGGCTGGACCAACACAC
 GTCCTTGGGCGGGGGGGCGGGGGCCGCCTTCTGGAGCGGGCGTTTCTGCGGCCGAG

CTCCGGAGCTGGAATGGGGCGGCCGGGGGAAGTGGACGCGATGGCACCGCCCGGGGT
GCGAGTGGGGCCGGGCGCGCGCGGGAGGGGAAAAAGGCGCGGGCGAGCCGCCAGC
GCGAGGTTTGTGGTGTCTGCCGATGTCCCTTCGGGGTACTCTAGCGCAGCCGCCTGGC
TACTTGACCCACTGCCACCAAACGTTTTAAATTCACCGAAAGCTTAGCTTCGAAGCA
AAGCTCCGTTTTCGCCGGTGAAGCAGGAAGCCTTCGCTGCAGGAAGTACCTTTACCT
CTTGGAGCGGCTTCTGCAGAAAAATCCCCGGGCAGAGATTTGGGCGGAGTTTGCCT
AGAACTAACGCGGAGCCAGCCGATCCCCGGCCTACCCCGGGGCCAAGATTTAGTGG
CTTCCCTTTTTCTAAACACTTCACGAGGGTCTGTTTCCGGGCTGTGCTCCCCGCCTA
GAAGGAAAATTTTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCG
CGTCCTCAGGACGGTTCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGC
AGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCCTGGCCAT
GCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGGTACGGCCGTGTCCCCATGTGACCTTAGAG
TCCCTTTCGAAACTGCTGTGCACAGTCGGTCACAATTTAGACACTGGTGAGAAGGG
TGGAGGAACCCTCTGGGGACAGCCAGGCAAGGTGACCAACCATCACCTAAGGGTG
GAGAAATTTAAGGGGTGAAGAGTCCCTTTTGCCTTTTCTGGATCCTGGTGATTCACC
TAGTGTCTTCCCTAAGGAACTGAACCAACTCCTCCGCTGGCCTCTGGCAGCCCTCCA
GGCGGTGCAGGATGGCGTGGGCCCGGTAGGAAGCTGCATGTAACCGCCCAGGGTCG
GGAGGCCAGGAGGGCAGCTCCTCCTCTGACTTGAATATTGAAAACAACTTCGTCTTG
CTTCTGAGCCCCTCTTAACCCATGACCCCCTAGCCCATTGGGGAGTAAATCTTAATTT
ACTCCTCTTCTGAAAAAGGATCTTTAAAACAGGTAGCTTCAACTCAAGCTTTATAA
AATAACAATATAGGGTTTCTCGGAACTGTATTTTTCTCAGCTGATGGTAACTGGACA
GGTCTGTAGAAGGGTGTATGACCTGGGTTTGGCAGGTGGAAGAGGGCAAAGGATAA
ACCCCTCCTCCTGCAGCCCCATATTCTTGGCCAGGTGTATTGTTGTAAACCAGGAGA
GAGTTTACTTCGGGGAGTATCCTGTTTTCCACTCAGTGAGGGCCAATGAAGAATGTC
TAATTCCATAAGATGCTTTTGTAAATCGGAATGTTGCTGTCCTCGGTGGTTCTGCT
GTTGGGACGGGACTGGCCTGAGCTGTGGGTGCTGTAGCAGGACAACCAGCTCACCT
AAGGGCCTCCAGTCTGGATTATCAATGGGTCAGTGCTGAACCTGGGCTAAAATATT
GTTTTTCCAATGATGTTGTCTTTCCCAAGCTCAGTGAAGCTAAATGTTTCACAGGCC
TATGTCAATCTGATGTAACCTTCGTGGCCACCTCTCTCCTGTTAGCCTCTGACCAAGG
TGGCACTGGATGGTTTCTGCCTGACCTTGGTGCCCCGTGGCAGCGACTGTGGGTCAT
GAAAGACATTCACTACGAGCCTGCTTCTGGAGTCCATCAGAAAACGGGATGCAACT
TGCCTAAAATGAGGAGAGGAGGATGCTTTTAAGAAAAAGAAGAAGGAGGATTCACT
ACCAGCTCTGAAGGGTGGAAAAGAGATGATTCATCCGGATTGTGGAGAGGGTGGAA
TCTTGTTTAGGAGAGCGTTGGTTGTGGCAGGCAGGGTGTAACCTATGAATCAGTGAAG
ACAATTCACATCCTGGGATGAAAAGAAGGCCATGGGCTCACAGGAGATTATCCACT
GGCCTCTCCACATCCGCTTGCAGTAAGGAGTGTGGGACTCTCCCAAGCTTCAGCGCT
GAACTGCAATGCAGTGACGTCGCTTAGCTGGGCCAGTAACCGAGGGAGTTGAATTT
TCTGTCATTTTAAAATAATGTGTCTTTTAAAGAAACACTTTGAAATTTAAACCACAGC
CCACAATTATAATGCACTGTTGCAGCACTTATCAAAACAGATATGCTAACTGAGCCA
TCAGTGCCAGCCTGACAGTGAGGCCACCAAGCCATCCACAAAGCCTACACGAAAGT

CTGTGCTCACAGTGGCTTTTCTCCATGAAGAGGGCATTCTAACCTCTTCCTTTCACG
TAGGAGGAAGCAAGGTCCTTTGTAAAATTTTAACTCGGGGTGCCTCAAATGTAAACT
TAACCACTGGTAACAACAGTTTCTACTGCTACATGCCACGTCTGTGAAAATTCATTCA
AGACATTAAGGAAAGTGGCTCAGCAGAGAGACTAGACATCTTATCCTCACGGTTCT
CCTGTACTTGGCCTCTCAGCCTTTGAGCAAGGTTGGCCCAAGCTAGTATCGGCCCCA
GTGGTACAGCCAAAACCTTGAGACTGCAAATGGATGCAGCTGTTGAACGCTGAGTAA
CTTCTGCAGAGTCAGGAAGACCCAAGGAAGCTCTGCAGAGGATGCAGGGGTACGGT
CAGAACCCCTGAGTGCCTTTCAGCTAACGAGGACTTTATGACACTCCCCAGCACAGC
AAATTTTTTATGATGTGTTTAAAGATTGGGTGAATTACTCAGGTGAACAAGCTACTTT
TTATCAGAGAACACCTAAAAACACGTTCAAGAGGGTTTGGGAACTATACATTTAATC
CTATGACAAACTAAGTTGGTTCTGTCTTCACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGTT
GGTGTGTTGCTCAGGAAGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCT
CCCTGTTCTGTCTAGCTAGTGATTCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTTCCAGAGCA
AACCGCCCAGAGTAGAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGT
GAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCG
CATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACT
TTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCC
CCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGC
TCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATC
AAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGG
TCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCA
TCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCA
GCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTC
CCGGCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTG
CATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAG
TCAAAAAAGCCAGTTTAACGCATTGCCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCAT
GAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCC
AACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTG
AAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCT
AATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGC
TGTTAGGGGTATTGGTGTAAGGTACTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATT
TGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGA
AGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAAC
ATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAG
TGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATT
TTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGAT
TGTAATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTT
TGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCAATTGTGGTC
ATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAG
TGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTA

AGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAA
CACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAA
GAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGG
GGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTAAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCT
AAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCT
TCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAA
GCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGC
CATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGAGGGTAA
GTATTTTCCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTATAATAAAGAATA
GCTTTAATGATATGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAA
ACATTAAAATATAATCTCTATAATAA

Иллюстративная расширенная последовательность геномной ДНК GJB2 человека, содержащая определенные регуляторные области (SEQ ID NO: 6)

GACTGTGAACTTAAGGCACAGCAGAGCTGGGGCTGCTCTTAAGGCCCTGCTG
TCTCTCCTCTTAGTAACAACACCATTTCACATGAAGTGACAGTGGTATCTTTTGTTGC
CCTGGAAATGGAATACAACAATGGCTTTCCAACCTTTTCTGTGGCAGAGACCTACAGA
CAGAAGTACATTTTACACTGGATCCAGGACACACATCAGTCTGAAAACACACACAT
GAACCAAACGTTTCCTAAAGCATTACTTATCCTTGCTAATAGCAACACATTCTCATA
TTCTTTTATACTTCATTTAATTTTCATATAAAAAAGAAAAGGAAAGGAAAGAAATCTA
TTTCTCAGCCCATTAATAAGGTCAGGAGCAGCAACACCAGACTAGAAGAAAAGCTT
ACCTATAGATTTTTTCTGCCACCTCTTGAGTGCGTCCAGCTTTCCGACAAGTCTCAGTG
CCATCTACTGTGCGCTCTGGGTATTGCAATTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
AGAATGAGACTAAGTCAGAGAACACAAAGAACTTCTTTCCCCACAGTGGAGATGGC
TCTGAAAGCGTTTAAGGAATAGCTTAGATGAGTGGCTAACACATTCTCCCGGTTCTG
AATTCTAAGACCACAGACTCCATGTCCAGTCCCCAAAGAGAGGCTTTGCAAGCTAC
AGAATACCCCTCTGACTGGGACCTCAGGAGCTAAACTGACCACGTAATTGGTTCTAG
AAAGTGAAACGTTTAAATTTGAAACATCCAAATGAGCATTTTGTGAAAAGCTACTGC
CGTCCATCAAATACAACACAGCCAGGGAGTCATCGCTCTATTGCCCTTGTCATCCT
ACATCTATAGTTTTTTTTTGTACAGCAGTTCATGAGTGTGACTCTATTCTAACTTGT
TCCAGAAGCCCTTCAAGATGATAGATAGCACAATATTTTTGTAGCCAGAGCTAGAAT
GTAGAGCTCTTTTTGGCTTCCTTGTAATGATCCAGAATTTCCATGTTGGCAAGCCAC
CATAATTTACAGAATTTACTTTTTATATTCAATAGAAGTAAAAAAAATTTACCTATTT
AAGGAGTTATAGCTCTGGATTCATTTCTGACCAAAATGTGCTTTTTTGACACAAATAC
AATTGGAAATGTCTTTGTAATTTATCCACAGTCTGCCTAGATAATCATAAAAGAACT
GCATGGATATATTTGTGAGTAAGAGCACGTGTCCATTGAGCAAAACCAAGGAGATC
AACTAATTCTACCATTGCCTTGAAACGGAGACACATCTAGCAGTTTGAATTTCCCCC
AAAAGATTGTATGTGTGAAAATAAGAATAGAATGAGGAAAATTTAAAAGCCTATAT
AATAATTTCAAGTCACAACCTTGGCAATTAGAATTTTATGAGATGTCTTTAATTTGGAA
GCAAAGAACAATTAAATTATTGAAGGCTGGAATTTTTTTTTTAACTCTTTGAATGGAA
CAACAGATTTTCCCCAAAAGATTTGACTTTAACAATTTTCAGAAAACATAAGTCAGG

GTGTGGTTCAATTACACAGAGAGAAATTGTAGTGAAATAGTGTTCCCTGTAATAATT
ACCCACAAAGGAGCACAGTGGAGCCACTCCTGCATTAAAATTACAGTATCATATGT
AAGTTATTATTAATTAACCAGAGATGCCAGGAGCTTGTGAGTTTCCAAGTCTATTT
TGAGGAGAGCTAAAGTTTCTCTTTTTTTGCCAGTTATTATTATTATTAATATTTCAAC
AGCAAGGCAAGAAAAGGGAATGTGGTCCATTAATAATGGCTCTTGAAAAGACACT
CAATGAATCCAAGTTGCCCTAAAAGTCCAAGTGGTAGGACAGTCTCTTCGCGTCTT
GCATCATTTTTCTGCCATCACCTACGTGTGATTTCGTGAGTCGGAAATTCAACCAAGAC
ATGTTTAATGTATATTTAGAGCATTCTTCCCGGCGGGAATTCACGGTGCCATTCCATC
AGGCAGTTGGCAAGCAGTCACTTGAAATATTAAGAAATATGATTTGTGTACACTGA
TTTATTGCAAAACAGCAACTTCTTTCTTTTTGGTTTCAATTTATAAAACAACTGTCAAAT
TAAATGCCAAATAGCTTTAAACATTAGCATTTTACCTTATAACCTTACAAGTGCA
TCACTTTAAACATCTGAGTAAAAGTTCAGCTCGATGACAATCACCTGGGATTTACCT
GCATGGTACTAAGCATATATGTAAAAATATTACTGATGGGTATCTCTGGCACTCTGA
AGTGACAAAGTGTAGCCTTCACAGATCTTTGTGAGTTAATCATCAATAGTTACCTGA
AAAGTGCCCACTTGCCATCATTCAAGATCAACCAGGCAGACACCACAGTGAGTTTTT
CATCAAAAAACCTTCTCTATCTGGTCAGTCTCTGCACGTCAATGAGACAAAGGTGTA
TGCTGCACGCAGCAGTACTATCCTAAGCTCCCTGTGTCCTCACCATGGGGCTGGGTG
GCTGGGGTGGAGGAACACAGGATTGGGCTTCAGCTTCTCTAGGGACTGGTACATTA
AGAGATGAAGACATAAAAGGTGAGAAAAACATGGTTTATTTCCAATGTTTCCATTTT
TGTTAAAAGTAATGCTTTCAACAGAAAAAAATGCAGCAATATAAGTGTGTAATTT
ACAAAATAATTTTCAAGATTTCTTTAATCATTATTTGTGGTGTGTCATCTGTTAACTGGA
TTTACGTCTAAGCTCATTTGTAAATAACTTCAAATATCCAAGCCTTCCCTCACCTTT
TCCCACCTCACCTCTCCTCCTTCTCCTCCCTACACTGGAGGACACTATGTACATGCA
TATAATGTCCTGCCCTAGAGGAGTCCTGAGCCTACTTGGGAAGAAAACACCAACTC
ACAGGAAAACAGCAGAAATCACACAAAACAGAATAAAAGCAAGCGCTGATCTGTA
AGTGAAGACTTAAGTGCTATAGGACTTCCAGCTACAAATCCTGAAAACACGGAGTG
GCTGTGATAATACGACTAGCCAACATCACACAGTAATTTTGCACATAAGGAGAACT
AAATCAAAGAAAACAAGGAAAAGAAAGTTGAGCCTATAATCGTGATACAGGCACT
AAAATCTCAGGTGACATTTTTTCAATGGGGGAAAGTCAGTCAACTTCCGATCTCCAAA
CCATCTTTACTAGCGAGCTTCCCACAATGGTTCTAGAACCTTCTTCATTCCAACCCA
ACCAGGATTCCAACAGACTCATAAACACCACAGCCTTTGAGAAATTAAGGGAGAA
CCCACCAACCGGCGCCCCACTCCCCACCCAAGTCACCTCTGGCTCAACCAAGATGC
GCTCAGGCCAAGAAAGCTGCCCCACCCACAGGCTTTGCCTGTGATTTTTTAACAAGC
CGACTCAGCACATCTCTCAGATGGGCCATGCAAGGCTTTTCGCAGCTCCTGGGGCTT
TGCCTCTTCATGAGCAGACACTCCCTCTTAGACTAAGACCTGGAGCTGGAAAGTAGG
TGGTAACCGCGGTACAAAACCTCACGCTCGTCCCTGCAGAACTGCCTAGGTGCGCCC
ATGGCCACGGGGCGCCAATTTTTCAAGGAAAAGTCAATGCTAATAATGGTGGCAAT
CACGGGAAATCCATTCTGAGGCCAGATCTGACTTGTGAGGATTAATCATCATTTCCA
CTTAAGTTTGAAGTACCTGGGTAAAAACGTGAGCGCGAGGGGACCAGGCTGCACC
TCTGACCTGGCTCCCTCTGCAAAAATCGCGAAGTGGGTGCCCCGAGGTGGGGCGGG

GGTTGGGGGAGACCTCCCCGGGAGTCCCCACCCAGCCTGCTCTGCACATCTTAGTCC
CTCATCCGCTTGCGCTGTGCAAATCTGTCTTCTGTCATTTGTATCGCAAGACATCAAA
ATCCCCAACCAAATGCAAATACTGAGACCTCATAATCTGAGACAAAGTTTCACGGT
ATCCAGAAAGCCCCCAGCAGGTGTGCAGTGCAGAGCCAGCCCCCAGCGGTCTTCC
GCAGAATCCTATCAGTTTCCCCCTTTCGTGCTGTGTGCATCGAGCAGGAAGGGGCTT
GGCAGGTTTTACCTGCCCTCTTTCCTTTCTGAAAAGTCTGGGCCTCCTCACCCCGAAA
GGAGTCACCTCCTTGCACTTCCCCAGTTGCGAAAAGAGGAGGAAGTTGGCTGGGCC
GGGGGCCGCGGGGGGCACCCTCCGCAGATGGCGGGACCCCCCTGCCGGCCATGGCA
AAAACGAGGCTTGTCTCTCCACCCGCCCCCAACCTTAGTCCTTGGCACATTGTTGAA
AGTAATTGAATAAAATCGGAAATTCGAGAAGGCGTTCGTTTCGGATTGGTGAGATTTT
GAGGGGAGAAAGAAGCGGGGACTTCGCCGGCACCAGCGGCGCCCCCTCCTCGGCCA
CCGTTAACCCCCATTCCAGAGGGCACTGCCCCGCCACCCAGCCTAGGTCCCCCTGCG
AGAGCCTCGCGGGCCCCGCGCAGCCTCCGCGACTCGAACAGATCTTCAGTCCTTGGA
GGAATGCCTGTTTCTCTAACAATAAAAAATTAAAGAAGCGCTCATAAATGCCAAGT
CCTCTCGCACTATGCGGAGTACAGAGGACAACGACCACAGCCATCCCTGAACCCCG
CCCACGGCACAGCGCCGGAGCCGGGGTCTGGGGCGCCGCTTCTGGGGGGTCCCGA
CTCTCAGCCGCCCCCGCTTACCCGGGGCCGCAAGGGGCTGGGGGAGGCGGCGCTC
GGGGTAACCGGGGGAGACTCAGGGCGCTGGGGGCACTTGGGGAACTCATGGGGGCT
CAAAGGAACTAGGAGATCGGGACCTCGAAGGGGACTTGGGGGGTTTCGGGGCTTTTCG
GGGGCGGTTCGGGGGTTTCGCGGACCCGGGAAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCG
CGCTCCGCCCCGCGGCGCCGCCCTCCGTAACTTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGC
GGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACAGGTGTTGCGGCCCCG
CAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCAGG
ACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCGC
CCCGGCCCGCGCGCTTCTCTCCCGACGCAGGTGAGCCCGCCGGCCCCCGACTGCC
GGCCAGGAACCTGGCGCGGGGAGGGACCGCGAGACCCAGAGCGGTTGCCCGGCCG
CGTGGGTCTCGGGGAACCGGGGGGCTGGACCAACACACGTCCTTGGGCCGGGGGGC
GGGGGCCGCCTTCTGGAGCGGGCGTTTCTGCGGCCGAGCTCCGGAGCTGGAATGGG
GCGGCCGGGGAAGTGACGCGATGGCACCGCCCGGGGTGCGAGTGGGGCCGGGCG
CGCGCGGGAGGGGAAAAAGGCGCGGGCGAGCCGCCAGCGCGAGGTTTGTGGTGTC
GCCGATGTCCCTTCGGGGTACTCTAGCGCAGCCGCCTGGCTACTTGACCCACTGCCA
CCAAACGTTTTAAATTCACCGAAAGCTTAGCTTCGAAGCAAAGCTCCGTTTCGCCGG
TGAAGCAGGAAGCCTTCGCTGCAGGAACTGACCTTTACCTCTTGGAGCGGCTTCTGC
AGAAAAATCCCCGGGCAGAGATTTGGGCGGAGTTTGCCTAGAACTAACGCGGAGCC
AGCCGATCCCGGCCTACCCCGGGGCCAAGATTTCACTGGCTTCCCTTTTTCTAAAC
ACTTCACGAGGGTCTGTTTCCGGGCTGTGCTCCCCGCCTAGAAGGAAAATTTTAGG
ACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCC
ATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCAC
CTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGA
GAAGCGTGGTACGGCCGTGTCCCATGTGACCTTAGAGTCCCTTTTCGAAACTGCTGT

GCACAGTCGGTCACAATTTTCAGACACTGGTGAGAAGGGTGGAGGAACCCTCTGGGG
 ACAGCCAGGCAAGGTCGACCACCCATCACCTAAGGGTGGAGAAATTTAAGGGGTGA
 AGAGTCCCTTTTGCCTTTTCTGGATCCTGGTGATTACCTAGTGTCTTCCCTAAGGAA
 CTGAACCAACTCCTCCGCTGGCCTCTGGCAGCCCTCCAGGCGGTGCAGGATGGCGTG
 GGCCCGGTAGGAAGCTGCATGTAACCGCCCAGGGTCGGGAGGCCAGGAGGGCAGCT
 CCTCCTCTGACTTGAATATTGAAAACAACCTTCGTCTGCTTCTGAGCCCCCTCTTAACC
 CATGACCCCTAGCCCATTTGGGGAGTAAATCTTAATTTACTCCTCTTCCTGAAAAAG
 GATCTTTAAACAGGTAGCTTCAACTCAAGCTTTATAAAATAACAATATAGGGTTTC
 TCGGAACCTGTATTTTTCTCAGCTGATGGTAACTGGACAGGTCTGTAGAAGGGTGTAT
 GACCTGGGTTTGGCAGGTGGAAGAGGGCAAAGGATAAACCCCTCCTCCTGCAGCCC
 CATATTCCTTGGCCAGGTGTATTGTTGTAAACCAGGAGAGAGTTTACTTCGGGGAGTA
 TCCTGTTTTCCACTCAGTGAGGGCCAATGAAGAATGTCTAATTCCATAAGATGCTTT
 TGTTAAATCGGAATGTTGCTGTCCTCGGTGGTTCTGCTGTTGGGACGGGACTGGCC
 TGAGCTGTGGGTGCTGTAGCAGGACAACCAGCTCACCTAAGGGCCTCCCAGTCTGG
 ATTATCAATGGGTCAGTGCTGAACCTGGGCTAAAATATTGTTTTTTCCAATGATGTT
 GTCTTTCCCAAGCTCAGTGAAGCTAAATGTTTCACAGGCCTATGTCAATCTGATGTA
 ACTTTCGTGGCCACCTCTCTCCTGTTAGCCTCTGACCAAGGTGGCACTGGATGGTTTC
 TGCCTGACCTTGGTGCCCCGTGGCAGCGACTGTGGGTCATGAAAGACATTCACTACG
 AGCCTGCTTCTGGAGTCCATCAGAAAACGGGATGCAACTTGCCTAAAATGAGGAGA
 GGAGGATGCTTTTAAGAAAAAGAAGAAGGAGGATTCACTACCAGCTCTGAAGGGTG
 GAAAAGAGATGATTCATCCGGATTGTGGAGAGGGTGGGAATCTTGTTTAGGAGAGCG
 TTGGTTGTGGCAGGCAGGGTGTAACCTATGAATCAGTGAAGACAATTCACATCCTGG
 GATGAAAAGAAGGCCATGGGCTCACAGGAGATTATCCACTGGCCTCTCCACATCCG
 CTTGCAGTAAGGAGTGTGGGACTCTCCCAAGCTTCAGCGCTGAACTGCAATGCAGTG
 ACGTCGCTTAGCTGGGCCAGTAACCGAGGGAGTTGAATTTTCTGTCATTTTAAATA
 ATGTGTCTTTTAAGAAACACTTTGAAATTAACCACAGCCCACAATTATAATGCAC
 TGTTGCAGCACTTATCAAAACAGATATGCTAACTGAGCCATCAGTGCCAGCCTGACA
 GTGAGGCCACCAAGCCATCCACAAAGCCTACACGAAAGTCTGTGCTCACAGTGGCT
 TTTCTCCATGAAGAGGGCATTCTTAACCTCTTCCTTTACAGTAGGAGGAAGCAAGGT
 CCTTTGTAAAATTTTAACCTCGGGGTGCCTCAAATGTAACTTAACCACTGGTAACAA
 CAGTTTCACTGCTACATGCCACGTCTGTGAAAATTCATTCAAGACATTAAGGAAAGT
 GGCTCAGCAGAGAGACTAGACATCTTATCCTCACGGTTCTCCTGTACTTGGCCTCTC
 AGCCTTTGAGCAAGGTTGGCCCAAGCTAGTATCGGCCCCAGTGGTACAGCCAAAAC
 TTGAGACTGCAAATGGATGCAGCTGTTGAACGCTGAGTAACTTCTGCAGAGTCAGG
 AAGACCCAAGGAAGCTCTGCAGAGGATGCAGGGGTACGGTCAGAACCCTGAGTGC
 CTTTCAGCTAACGAGGACTTTATGACACTCCCCAGCACAGCAAATTTTTATGATGTG
 TTTAAAGATTGGGTGAATTACTCAGGTGAACAAGCTACTTTTTATCAGAGAACACCT
 AAAAACACGTTCAAGAGGGTTTGGGAACTATACATTTAATCCTATGACAAACTAAG
 TTGGTTCTGTCTTCACCTGTTTTTGGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGGTGTTTGCTCAGGA
 AGAGATTTAAGCATGCTTGCTTACCCAGACTCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCTTA

GCTAGTGATTCCCTGTGTTGTGTGCATTCGTCTTTTCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTA
 GAAGATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCA
 CCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGT
 TGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCC
 TGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCACATCC
 GGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGC
 ACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAA
 GAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCT
 CCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCT
 TCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGT
 GCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGA
 AGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGT
 CACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGT
 TTAACGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGC
 AACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTG
 ACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCA
 CAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCT
 TAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGG
 TGTAAGGTACTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGG
 ACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCC
 TGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCAATTG
 CTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTT
 ACCTTTTTTGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGT
 TCTGGATAACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATG
 GTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTT
 TGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTATTGTGGTCATAGCACCTAACAAC
 ATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAG
 CAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGA
 TGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCAT
 GACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATT
 TTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAA
 GTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAA
 GATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTT
 AAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAA
 TATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGG
 TTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGAAGGTAAGTATTTTCCTGTTGTCA
 AGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTT
 GTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAAAATATAATCT
 CTATAATAATTTAAAATCTAATATGGTTTTAATAGAACAGCAAATTTTAATTTTCATCT
 ATCACTTTTTATATAAATAACATTAATGTTTTATATTTTATAAACACCAATGGGTAAGTT

GCCAGAGTGTCTGACCCCATTTCTGCCCCAGTTACAGAAAAGCTTCTGTCACCAGAAA
 GTTTGGTGGGGAAGGAAGGGAGGAAGATGATTTCTACCTAACCCCGTGCCACCTC
 TACCAGGTTTTTGAGGCATATCAGTCTATGGACAATGTGGTGTGGTCTGGAAACG
 TACCTTGGTGAATGCTGAGTTGGCTGGACATGACCCGTTTAGCTCCTGGATGAATCC
 CAGAAGTGGACCTTCAAAATGTTACTCATAGCATGACCTTGGCTCACTGCAACCTCT
 GCCTCCCAGGCTCAAGCGATCCTCCACCTCAGCGTCCCAAGTAGCTGGGACCACTG
 GAGTGTGCCACCACACTCCACTAATTTTTTTCATTTTTTTGTAGAAACGAGGTCCCACTA
 TATTGCCCAGTCTGGTCTCGAACTCCTGGGCTGAAGGGATCCCCCTGCCTCAGTCTC
 CTAAAGTGCAAGGATTACAGGCATGGGCCACCGCACCTGGCCTGAAACTGCTTTTTTA
 TTCCTCAGTGCCCACTTCCATGGGAAATAAGCCTGCCAGGTCAGCCTGTCCCCATGG
 GAGTGACTGCCTGCTACCCCCACAGGCTTGCCCGGCCCTCGTGAGCCTCTCCCAGAG
 ACACCACCAACAGTTCTGTTCTTTTCATGGTACAAGATTTCCATCCAAGGATTTCAAA
 GCATTTACACATCAATAATTAGAAGTATTTTCATAGAGGACCATACTTTTTAAAA
 TGGATTTCAAAGAACAAAAACCAGTCAACTATCACCCAGGTAATAGAAAATGGGAA
 ATGGTTTTCTACCTGACTTCCAAAATGCTCTGCACATAGACTGTGAAAATAGGATTTT
 TTAAGCTGGGTGCAGAGGCTTATACCTATAATCCCAACACTTTGGGAGGCTGAGACG
 AGAGGATCACTTGAGCCCAGGAGTTCAAAACCAGCCTGGGCAATATAGGGAGACAT
 TGTTTTCTATAAAAAATAAAAAATGTTAGCCAGGCAGGCGTGGTAACATGTGCCTGTAG
 TCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTGGGAAGATTGCTTGAACCTGGGAGGTCCATG
 CTGCAGTGAGCTGAGATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTAGGCGACAGCAAGATCCT
 GTCCCAAACAACAACAACATCAAAAAACACAGAACTTTTAAAATAAGTACATTAC
 TTCTACAAGCTATGTAGATTATTACTCTCAAGCTATTTAAAAGACCAAGCCAAAATAA
 TTATGGGCTACTCTCGACCACTTGTAGGAATGGATAGAGAGGTCTGGTCACATGCCT
 GGAAATTAGAGCTTGAGCTCTGAAAATGATAATCCTGACTATATCTCAAAGCATCAG
 TCTGCACTTTGTATGGAGCAAGAAAAAGCCTTGTGGAAGCGGCCTCCCACCCAGCC
 GAGCCCTCGGCGTGGACAAGCTCTGCTTTTTATGAGCAGTGGGTGCAGCCTCGCTGC
 TCCCTCCTCCTGTCAAAAGACAGTCACAGCTGGGGTGAGCAGATCGGGCCCACTTGG
 GAGGCCCAAGGAATATGCTGCAGGGGTGCGGCCTGAGCCACCCCCACGGGTGGT
 CTTTGACAAGTAGAGAGCAGCTGAGAGGTGGGTAAAAGCTCACTCACTTACCCTGA
 CCTCAGTGTCTCATCTTAAAATGGGTTTCCTGAATCTTTCCCCGGCTTAGTGGCAAT
 GAAATAAGATAATTTATGTAAACGTTCTCCACATAGTAAAGCACTAAGTAACATATG
 ACTGTCATCTGTTTTCCACTAGACAGATCCCAACCTGGAAGAGTGACAGATGGTATT
 TCAGATACAAGTGACTCAAGCAAAGCTTGATAAACTGGGGGCTGGAAAAAAATGCA
 CATTTACACAAAGCCTGGAGTAACTGC

ТАБЛИЦА 1: Нуклеотиды, соответствующие Интронам и Эксонам в SEQ ID NO: 5

Элемент	Нуклеотиды	Элемент	Нуклеотиды
Изоформа 1 Экзон 1	1-156	Изоформа 1 Интрон 1	157-3335
Изоформа 1 Экзон 2	3336-5469		
Изоформа X1 Экзон 1	795-978	Изоформа X1 Интрон 1	979-3335

Изоформа X1 Экзон 2	3336-5469		
---------------------	-----------	--	--

ТАБЛИЦА 2: Нуклеотиды, соответствующие Интронам и Эксонам в SEQ ID NO: 6

Элемент	Нуклеотиды	Элемент	Нуклеотиды
Изоформа 1 Экзон 1	5,038-5,193	Изоформа 1 Интрон 1	5,194-8,372
Изоформа 1 Экзон 2	8,373-10,506		
Изоформа X1 Экзон 1	5,832-6,015	Изоформа X1 Интрон 1	6,016-8,372
Изоформа X1 Экзон 2	8,373-10,506		

[0100] В настоящем раскрытии признается, что определенные изменения полинуклеотидной последовательности не будут влиять на ее экспрессию или белок, закодированный указанным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит ген GJB2, имеющий одну или несколько молчащих мутаций. В некоторых вариантах осуществления в раскрытии представлен полинуклеотид, который содержит ген GJB2, имеющий одну или несколько молчащих мутаций, например ген GJB2, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, но кодирующую ту же аминокислотную последовательность, что и функциональный ген GJB2. В некоторых вариантах осуществления в раскрытии представлен полинуклеотид, который содержит ген GJB2, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько мутаций (например другую аминокислотную последовательность по сравнению с последовательностью, полученной от функционального гена GJB2), причем одна или несколько мутаций представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления в раскрытии представлен полинуклеотид, который содержит ген GJB2, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько мутаций (например другую аминокислотную последовательность по сравнению с последовательностью, полученной от функционального гена GJB2), причем одна или несколько мутаций не находятся в пределах характеристической части гена GJB2 или закодированного белка коннексина 26. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно настоящему раскрытию содержит ген GJB2, идентичный по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно настоящему раскрытию содержит ген GJB2, идентичный последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Как можно понять в данной области SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6 можно оптимизировать (например оптимизировать по кодонам) для достижения повышенной или оптимальной экспрессии у животного, например млекопитающего, например человека.

Полипептиды, Закодированные Геном GJB2

[0101] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлены полипептиды, закодированные геном GJB2 или его характеристической частью. В некоторых вариантах

осуществления геном GJB2 является ген GJB2 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 мышиных. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 приматов. В некоторых вариантах осуществления геном GJB2 является ген GJB2 человека.

[0102] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит белок коннексин 26 или его характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления белок коннексин 26 или его характеристическая часть представляет собой белок коннексин млекопитающих 26 или его характеристическую часть, например белок коннексин 26 примата или его характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления белок коннексин 26 или его характеристическая часть представляет собой белок коннексин 26 человека или его характеристическую часть.

[0103] В некоторых вариантах осуществления полипептид, представленный в настоящем документе, содержит посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления белок коннексин 26 или его характеристическая часть, представленные в настоящем документе, содержит посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционные модификации могут включать без ограничения гликозилирование (например N-связанное гликозилирование, O-связанное гликозилирование), фосфорилирование, ацетилирование, амидирование, гидроксильное, метилирование, убиквитилирование, сульфатацию и/или их комбинацию. Иллюстративная последовательность белка коннексина 26 человека представляет собой или содержит последовательность SEQ ID NO: 7.

Иллюстративная Последовательность белка коннексина 26 человека (SEQ ID NO: 7)

MDWGTLQTLGGVKNHSTSIGKIWLTVLFIFRIMLVVAAKEVWGDEQADFVCN
TLQPGCKNVCYDHYFPISHIRLWALQLIFVSTPALLVAMHVAAYRRHEKKRKFGEIKSE
FKDIEEIKTQKVRIEGLWWTYTSSIFFRVIFEAAFMVVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWP
CPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMIAVSGICILLNVTCLYLLIRYCSGKSKKPV

[0104] В настоящем раскрытии признается, что определенные мутации в аминокислотной последовательности полипептида, описанного в настоящем документе (например, содержащего коннексин 26 или его характеристическую часть), не будут влиять на экспрессию, складывание или активность полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид (например, содержащий коннексин 26 или его характеристическую часть) содержит одну или несколько мутаций, причем одна или несколько мутаций представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно настоящему раскрытию содержит коннексин 26 или его характеристическую часть, идентичную по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно настоящему раскрытию содержит коннексин 26 или его характеристическую часть, идентичную последовательности SEQ ID NO: 7. В

некоторых вариантах осуществления полипептид согласно настоящему раскрытию содержит коннексин 26 или его характеристическую часть, идентичную по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно настоящему раскрытию содержит белок коннексин 26 или его характеристическую часть, идентичную последовательности SEQ ID NO: 7.

Конструкции

[0105] Среди прочего, в настоящем раскрытии показано, что некоторые полинуклеотиды, как описано в настоящем документе, представляют собой полинуклеотидные конструкции. Полинуклеотидные конструкции согласно настоящему раскрытию включают в себя все, конструкции, известные в данной области, включая космиды, плазмиды (например оголенные или содержащиеся в липосомах) и вирусные конструкции (например лентивирусные, ретровирусные, аденовирусные и аденоассоциированные вирусные конструкции), которые содержат полинуклеотид, содержащий ген GJB2 или его характеристическую часть. Специалисты в данной области способны выбрать приемлемые конструкции, а также клетки, для получения любых полинуклеотидов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления конструкцией является плазида (то есть молекула кольцевой ДНК, которая может автономно реплицироваться в клетке). В некоторых вариантах осуществления конструкцией может быть космида (например серия pWE или sCos).

[0106] В некоторых вариантах осуществления конструкцией является вирусная конструкция. В некоторых вариантах осуществления вирусной конструкцией является лентивирусная, ретровирусная, аденовирусная или аденоассоциированная вирусная конструкция. В некоторых вариантах осуществления конструкцией является аденоассоциированная вирусная (AAV) конструкция (см., например Asokan et al., Mol. Ther. 20: 699-7080, 2012, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления вирусной конструкцией является аденовирусная конструкция. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция также может быть на основе альфавируса или получена из него. Альфавирусы включают вирус Sindbis (и VEEV), вирус Aura, вирус Babanki, вирус Barmah Forest, вирус Bebaru, вирус Cabassou, вирус Chikungunya, вирус восточного лошадиного энцефалита, вирус Everglades, вирус Fort Morgan, вирус Getah, вирус Highlands J, вирус Kyzylagach, вирус Mayo, вирус Me Tri, вирус Middelburg, вирус Mosso das Pedras, вирус Mucambo, вирус Ndumu, вирус O'nyong-nyong, вирус Pixuna, вирус Rio Negro, вирус Ross River, вирус болезни поджелудочной железы лосося, вирус Semliki Forest, вирус южного морского слона, вирус Tonate, вирус Trosara, вирус Una, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей и вирус Whartaroa. Обычно, геном таких вирусов кодирует неструктурные (например репликон) и структурные белки (например капсид и оболочкой), которые могут транслироваться в цитоплазме клетки-хозяина вирус. Ross River, вирус Sindbis, вирус Semliki Forest (SFV) и вирус венесуэльского энцефалита

лошадей (VEEV) использовали для разработки вирусных конструкций для доставки кодирующей последовательности. Псевдотипированные вирусы могут быть образованы путем комбинирования гликопротеинов оболочки альфавирусов и ретровирусных капсид. Примеры альфавирусных конструкций можно найти в публикации США №№ 20150050243, 20090305344 и 20060177819; конструкции и способы их получения полностью включены в настоящий документ посредством ссылки на каждую из публикаций.

[0107] Конструкции, представленные в настоящем документе, могут иметь разные размеры. В некоторых вариантах осуществления конструкцией является плазида, которая может иметь общую длину до примерно 1 т.п.н., до примерно 2 т.п.н., до примерно 3 т.п.н., до примерно 4 т.п.н., до примерно 5 т.п.н., до примерно 6 т.п.н., до примерно 7 т.п.н., до примерно 8 т.п.н., до примерно 9 т.п.н., до примерно 10 т.п.н., до примерно 11 т.п.н., до примерно 12 т.п.н., до примерно 13 т.п.н., до примерно 14 т.п.н. Или до примерно 15 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкцией является плазида, которая может иметь общую длину в диапазоне от примерно 1 т.п.н. До примерно 2 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 3 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 8 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 9 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 10 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 11 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 12 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 13 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 14 т.п.н. Или от примерно 1 т.п.н. До примерно 15 т.п.н.

[0108] В некоторых вариантах осуществления конструкцией является вирусная конструкция, которая может иметь общее число нуклеотидов до 10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция может иметь общее число нуклеотидов в диапазоне от примерно 1 т.п.н. До примерно 2 т.п.н., от 1 т.п.н. До примерно 3 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 8 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 9 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 10 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 3 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 8 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 9 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 10 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 8 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 9 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 10 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 8 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 9 т.п.н., от примерно 4 т.п.н. До примерно 10 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. До примерно 6 т.п.н., от примерно 5 т.п.н. До примерно 7 т.п.н., от

примерно 7 т.п.н., от примерно 6 т.п.н. До примерно 8 т.п.н. Или примерно 7 т.п.н. До примерно 8 т.п.н.

[0111] Любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать управляющую последовательность, например управляющую последовательность, выбранную из группы последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, промоторной последовательности, энхансерной последовательности, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли(А)), консенсусной последовательности Козака и/или дополнительных нетранслированных областей, которые могут вмещать пре- или посттранскрипционные регуляторные и/или управляющие элементы. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифический промотор. В настоящем документе описаны неограничивающие примеры управляющих последовательностей.

AAV Частицы

[0112] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлены частицы AAV, которые содержат конструкцию, кодирующую ген GJB2 или его характеристическую часть, описанную в настоящем документе, и капсид, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV могут быть описаны, как имеющие серотип, который представляет собой описание штамма конструкции и штамма капсида. Например, в некоторых вариантах осуществления частица AAV может быть описана, как AAV2, причем частица имеет капсид AAV2 и конструкцию, которая содержит характеристические инвертированные концевые повторы (ITR) AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица AAV может быть описана, как псевдотип, в котором капсид и конструкция получены из разных штаммов AAV, например, AAV2/9 будет относиться к частице AAV, которая содержит конструкцию с AAV2 ITR и капсид AAV9. В некоторых аспектах капсид AAV представляет собой капсид Anc80 (например капсид Anc80L65).

AAV Конструкция

[0113] В настоящем раскрытии представлены полинуклеотидные конструкции, которые содержат ген GJB2 или его характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в частицу AAV может быть включен полинуклеотид, содержащий ген GJB2 или его характеристическую часть.

[0114] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная конструкция содержит один или несколько компонентов, полученных или модифицированных из природной геномной AAV конструкции. В некоторых вариантах осуществления последовательность, полученная из AAV конструкции, является AAV1 конструкция, AAV2 конструкция, AAV3 конструкция, AAV4 конструкция, AAV5 конструкция, AAV6 конструкция, AAV7 конструкция, AAV8 конструкция, AAV9 конструкция, AAV2,7m8 конструкция, AAV8BP2 конструкция, AAV293 конструкция или AAV Anc80 конструкция.

В данной области известны дополнительные иллюстративные AAV конструкции, которые могут быть использованы в настоящем документе. См., например Kanaan et al., *Mol. Ther. Nucleic Acids* 8:184-197, 2017; Li et al., *Mol. Ther.* 16(7): 1252-1260, 2008; Adachi et al., *Nat. Commun.* 5: 3075, 2014; Isgrig et al., *Nat. Commun.* 10(1): 427, 2019; и Gao et al., *J. Virol.* 78(12): 6381-6388, 2004; каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0115] В некоторых вариантах осуществления представленные конструкции содержат кодирующую последовательность, например ген GJB2 или его характеристическую часть, одну или несколько регуляторных и/или управляющих последовательностей и необязательно полученные из AAV 5'-и 3'-инвертированные концевые повторы (ITR). В некоторых вариантах осуществления, где используют полученный из AAV 5'-и 3'-ITR, полинуклеотидная конструкция может называться конструкция рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления представленные конструкции rAAV упакованы в капсид AAV для образования частицы AAV. В некоторых аспектах капсид AAV представляет собой Anc80 капсид (например Anc80L65 капсид).

[0116] В некоторых вариантах осуществления полученные из AAV последовательности (которые содержатся в полинуклеотидной конструкции) обычно содержат цис-действующие 5'-и 3'-ITR последовательности (см., например B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses," ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168, 1990, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Обычные последовательности ITR, полученных из AAV2, имеют длину примерно 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления в конструкцию, представленную в настоящем документе, включено по меньшей мере 80% обычной последовательности ITR (например по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%). Способность модифицировать эти последовательности ITR находится в пределах компетенции специалистов в данной области. (См., например, такие тексты как Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; и K. Fisher et al., *J Virol.* 70:520 532, 1996, каждый из которых полностью включен посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления любые из кодирующих последовательностей и/или конструкций, описанных в настоящем документе, фланкированы последовательностями 5'-и 3'-ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая указанные в настоящем документе типы AAV.

[0117] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные конструкции, описанные согласно настоящему раскрытию и по схеме, известной в данной области (см., например Asokan et al., *Mol. Ther.* 20: 699-7080, 2012, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), обычно состоят из кодирующей последовательности или ее части, по меньшей мере одной и/или управляющей последовательности и необязательно 5'-и 3'-инвертированных концевых повторов AAV (ITR). В некоторых вариантах осуществления для создания частицы AAV представленные

конструкции могут быть упакованы в капсид. Частица AAV может быть доставлена в выбранную клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления представленные конструкции содержат дополнительную необязательную кодирующую последовательность, которая представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты (например ингибирующую последовательность нуклеиновой кислоты), гетерологичную последовательностям конструкции, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например миРНК, ингибитор миРНК) или другой представляющий интерес генный продукт. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с компонентами и/или управляющими компонентами таким образом, чтобы обеспечить транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию кодирующей последовательности в клетке ткани-мишени.

[0118] Как показано на фиг. 1, панель (А), эндогенный геном немодифицированного AAV содержит две открытые рамки считывания, «сар» и «гер», фланкированные ITR. Как показано на фиг. 1, панель (В), иллюстративные конструкции гAAV аналогично содержат ITR, фланкирующие область кодирования, например кодирующую последовательность (например ген GJB2). В некоторых вариантах осуществления гAAV конструкция также содержит обычные регуляторные элементы, которые функционально связаны с кодирующей последовательностью таким образом, чтобы обеспечить ее транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидной конструкцией или инфицированной вирусом, полученным согласно раскрытию. В некоторых вариантах осуществления гAAV конструкция необязательно содержит промотор (показано на фиг. 1, панель (В)), энхансер, нетранслируемую область (например 5'-UTR, 3'-UTR), последовательность Козака, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты сплайсинга (например акцепторный сайт, донорный сайт), сайт полиаденилирования (показано на фиг. 1, панель (В)) или любую их комбинацию.

[0119] В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, ген hGJB2, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2А и 2Е). В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, ген hGJB2, 3'-UTR, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2В). В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, ген hGJB2, домен С3, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2С). В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, ген hGJB2, домен D7, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2D). В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, 5'-UTR, ген hGJB2, необязательную метку FLAG, 3'UTR, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2F-2J, 2L и 2N). В некоторых аспектах гAAV конструкция содержит 5'-ITR, промотор, 5'-UTR, ген hGJB2, необязательную метку FLAG, 3'-UTR, регуляторный сайт-мишень микроРНК, полиА и 3'-ITR (показано на фиг. 2M). Такие дополнительные элементы описаны дальше в настоящем документе.

[0120] В некоторых вариантах осуществления конструкцией является гAAV конструкция. В некоторых вариантах осуществления гAAV конструкция может содержать

по меньшей мере 500 п.н., по меньшей мере 1 т.п.н., по меньшей мере 1,5 т.п.н., по меньшей мере 2 т.п.н., по меньшей мере 2,5 т.п.н., по меньшей мере 3 т.п.н., по меньшей мере 3,5 т.п.н., по меньшей мере 4 т.п.н. Или по меньшей мере 4,5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления AAV конструкция может содержать самое большее 7,5 т.п.н., самое большее 7 т.п.н., самое большее 6,5 т.п.н., самое большее 6 т.п.н., самое большее 5,5 т.п.н., самое большее 5 т.п.н., самое большее 4,5 т.п.н., самое большее 4 т.п.н., самое большее 3,5 т.п.н., самое большее 3 т.п.н. Или самое большее 2,5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления AAV конструкция может содержать от примерно 1 т.п.н. До примерно 2 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 3 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 1 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 3 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 2 т.п.н. До примерно 5 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 4 т.п.н., от примерно 3 т.п.н. До примерно 5 т.п.н. Или примерно 4 т.п.н. До примерно 5 т.п.н.

[0121] Любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать регуляторные и/или управляющие последовательности, например управляющую последовательность, выбранную из группы из последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, промоторной последовательности, энхансерной последовательности, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли(А)), консенсусной последовательности Козака и/или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления промотором может быть нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифический промотор. В настоящем документе описаны неограничивающие примеры управляющих последовательностей.

Иллюстративные компоненты конструкции

Последовательности инвертированных концевых повторов (ITR)

[0122] Полученные из AAV последовательности конструкции обычно содержат cis-действующие 5'-и 3'-ITR (См., например, В. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., Р. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Обычно ITR способны образовывать шпильку. Способность образовывать шпильку может способствовать способности самовоспроизведения ITR, обеспечивая синтез второй цепи ДНК независимо от праймазы. ITR также участвуют в интеграции AAV конструкции (например кодирующей последовательности, например гена GJB2) в геном клетки субъекта. ITR могут также помогать эффективному инкапсулированию AAV конструкции в частице AAV.

[0123] Частица rAAV (например частица AAV2/Anc80) согласно настоящему раскрытию может содержать rAAV конструкцию, содержащую кодирующую последовательность (например ген GJB2) и связанные элементы, фланкированные последовательностями 5'-и 3'-ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой или содержит примерно 145 нуклеиновых кислот. В некоторых аспектах ITR представляет собой или содержит примерно 119 нуклеиновых кислот. В

некоторых аспектах ITR представляет собой или содержит примерно 130 нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используют все или по существу все последовательности, кодирующие ITR. ITR AAV последовательность может быть получена из любого известного AAV, включая указанные в настоящем документе типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR AAV2.

[0124] Примером молекулы конструкции, используемой в настоящем раскрытии, является «цис-действующая» конструкция, содержащая трансген, причем выбранная последовательность трансгена и связанные регуляторные элементы фланкированы последовательностями 5'- или «левого» и 3'- или «правого» ITR AAV. Обозначения 5'- и левая относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции, если читать слева-направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 5'- или левый ITR представляет собой ITR, расположенный ближе всего к промотору (в отличие от последовательности полиаденилирования) для данной конструкции, когда конструкция изображена в смысловой ориентации линейно. Одновременно обозначения 3'- и правая относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции, если читать слева-направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 3'- или правый ITR представляет собой ITR, расположенный ближе всего к последовательности полиаденилирования (в отличие от промоторной последовательности) для данной конструкции, когда конструкция изображена в смысловой ориентации линейно. ITR, представленные в настоящем документе, изображены в порядке 5'-3' в соответствии со смысловой цепью. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что ITR 5'- или с «левой» ориентацией также может быть изображена как 3'- или «правый» ITR, при преобразовании из смыслового в антисмысловое направление. Кроме того, специалист в данной области вполне способен трансформировать данную смысловую последовательность ITR (например 5'/левый ITR AAV) в антисмысловую последовательность (например в последовательность 3'/правого ITR). Рядовому специалисту в данной области будет понятно, как изменить данную последовательность ITR для применения в качестве либо 5'/левого или 3'/правого ITR, либо их антисмыслового варианта.

[0125] например, в некоторых вариантах осуществления ITR (например 5'-ITR) может иметь последовательность согласно SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления ITR (например 3'-ITR) может иметь последовательность согласно SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит одну или несколько модификаций, например усечения, делеции, замены или вставки, как известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит менее 145 нуклеотидов, например 127, 130, 134 или 141 нуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR содержит 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143 144 или 145 нуклеотидов. В некоторых аспектах ITR содержит примерно 119

нуклеотидов. В некоторых аспектах ITR содержит примерно 130 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления ITR (например 5'-ITR) может иметь последовательность согласно SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления ITR (например 3'-ITR) может иметь последовательность согласно SEQ ID NO: 53.

[0126] неограничивающий пример последовательности 5'-ITR AAV включает SEQ ID NO: 8 или 52. Неограничивающий пример последовательности 3'-ITR AAV включает SEQ ID NO: 9 или 53. В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-ITR AAV (например SEQ ID NO: 8 и 9 или SEQ ID NO: 52 и 53) фланкируют часть кодирующей последовательности, например весь или часть гена GJB2 (например SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6). Способность изменения этих последовательностей ITR находится в пределах компетенции специалистов в данной области. (См., например, такие тексты как Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-ITR идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% последовательности 5'-ITR, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-ITR идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% последовательности 3'-ITR, представленной в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-ITR идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% последовательности 5'-ITR, представленной в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-ITR идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% последовательности 3'-ITR, представленной в SEQ ID NO: 53.

Иллюстративный 5'-ITR AAV (SEQ ID NO: 8)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT

Иллюстративный 3'-ITR AAV (SEQ ID NO: 9)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Иллюстративный 5'-ITR AAV (SEQ ID NO: 52)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC
TAGGGGTTTCCT

Иллюстративный 3'-ITR AAV (SEQ ID NO: 53)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Промоторы

[0127] В некоторых аспектах раскрытие относится к конструкциям, содержащим селективный к клеткам промотор, который может быть использован для регулирования (например увеличения) экспрессии белка коннексина 26 в клетке (например в клетке внутреннего уха, например в поддерживающей клетке). В некоторых аспектах конструкции обеспечивают пониженную токсичность, что может быть связано с экспрессией коннексина 26 в некоторых клетках (например в клетках внутреннего уха, например в волосковых клетках).

[0128] В некоторых вариантах осуществления конструкция (например гAAV конструкция) содержит промотор. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой ферментами/белками, которые могут способствовать и/или инициировать транскрипцию функционально связанного гена (например гена GJB2). Например, промотор обычно относится, например, к нуклеотидной последовательности, с которой связывается РНК-полимераза и/или любой связанный фактор и с которой он может инициировать транскрипцию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция (например гAAV конструкция) содержит промотор, функционально связанный с одним из неограничивающих иллюстративных промоторов, описанных в настоящем документе.

[0129] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, промотор клеток млекопитающих, вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифический промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, например промотор РНК-полимеразы II млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы III, включая без ограничения промотор HI, промотор U6 человека, промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Обычно промотор будет представлять собой промотор, способный стимулировать транскрипцию в клетке внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для улитки промотор или ориентированный относительно улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для волосковых клеток промотор или специфический для поддерживающих клеток промотор.

[0130] В данной области известно множество промоторов, которые можно использовать в настоящем документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в настоящем документе, включают: промоторы EF1 α человека, цитомегаловируса человека (CMV) (патент США № 5168062, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), убиквитина С человека (UBC), фосфолипидкиназы 1 мыши, аденовируса полиомы, обезьяньего вируса 40 (SV40), β -глобина, β -актина, α -фетопротейна, γ -глобина, β -интерферона, γ -глутамилтрансферазы, вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса саркомы Рауса, инсулина крысы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, металлотронеина II (MT II), амилазы, катепсина,

мускаринового рецептора MI, ретровирусного LTR (например вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV), ITR AAV, интерлейкина-2, коллагеназы, тромбоцитарного фактора роста, аденовируса 5 E2, стромелизина, мышинового гена MX, регулируемых глюкозой белков (GRP78 и GRP94), α -2-макроглобулина, виментина, гена H-2K b MHC класса I, HSP70, пролиферина, фактора некроза опухоли, гена тиреотропного гормона, легкой цепи иммуноглобулина, Т-клеточного рецептора, HLA DQa и DQ, рецептора интерлейкина-2, MHC класс II, HLA-DRa MHC класс II, мышечной креатинкиназы, преальбумин (транстиретин), эластазу I, ген альбумина, c-fos, c-HA-ras, молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), гистона H2B (TH2B), гормона роста крысы, амилоида сыворотки человека (SAA), тропонина I (TN I), мышечной дистрофии Дюшенна, вируса иммунодефицита человека, ATOH1, GJB2, SLC26A4, LGR5, SYN1, GFAP, GDF6, IGFBP2, RBP7, GJB6, PARM1 и вируса лейкоза гиббонов (GALV). В данной области известны дополнительные примеры промоторов. См., например, Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman и Company, New York 2007, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой немедленно-ранний промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит энхансерную/промоторную конструкцию CMV/CBA, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит энхансерную/промоторную конструкцию CMV/CBA, приведенную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит промотор CAG или энхансерную/промоторную конструкцию CMV/CBA/SV-40, приведенную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит промотор CAG или энхансерную/промоторную конструкцию CMV/CBA/SV-40, приведенную в SEQ ID NO: 15. В некоторых аспектах промотор содержит энхансерную/промоторную конструкцию ATOH1 согласно SEQ ID NO: 16. В некоторых аспектах промотор содержит энхансерную/промоторную конструкцию GJB2 согласно SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах промотор содержит энхансерную/промоторную конструкцию GJB2 согласно SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность SLC26A4 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность LGR5 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 55. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность SYN1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 56. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность GFAP человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 62. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность

IGFBP2 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 95. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор RBP7 человека, приведенный в SEQ ID NO: 98. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор GJB6 человека, приведенный в SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор PARM1 человека, приведенный в SEQ ID NO: 104

[0131] В некоторых аспектах промотор содержит GJB6 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор GJB6 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах GJB6 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0132] В некоторых аспектах промотор содержит промотор IGFBP2 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор IGFBP2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 95, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах IGFBP2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 95, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0133] В некоторых аспектах промотор содержит промотор RBP7 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор RBP7 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 98, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах RBP7 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 98, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0134] В некоторых аспектах промотор содержит промотор GJB6 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор GJB6 содержит последовательность

нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 101, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах GJB6 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 101, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0135] В некоторых аспектах промотор содержит промотор PARM1 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор PARM1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 104, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах PARM1 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 104, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0136] В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную последовательность промотора GDF6 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 90. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 95. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 98. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 104.

[illegible]

некоторых аспектах энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 55. В некоторых аспектах энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 56. В некоторых аспектах энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 62. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 90.

[0138] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, когда функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок (например белок коннексин 26), вызывает транскрипцию РНК из нуклеиновой кислоты в клетке при большей части или во всех физиологических условиях.

[0139] Примеры конститутивных промоторов включают без ограничения ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (см., например Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и EF1-альфа промотор (Invitrogen). В некоторых аспектах промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых аспектах конститутивный промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV, энхансер/промотор CMV/CBA или промотор CB7. В некоторых аспектах энхансер/промотор CMV/CBA содержит нуклеиновую кислоту с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 12 или 13. В некоторых аспектах энхансер/промотор CMV/CBA содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах энхансер/промотор CMV/CBA содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 13. В некоторых аспектах промотор CBA содержит нуклеиновую кислоту с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых аспектах промотор CBA содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах промотор CBA содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 11.

[0140] В некоторых аспектах промотор CMV содержит нуклеиновую кислоту с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 14 или 15. В некоторых аспектах промотор CMV содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах промотор CMV содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 15.

[0141] Индуцибельные промоторы обеспечивают регуляцию экспрессии гена и могут регулироваться экзогенно доставляемыми соединениями, экологическими факторами, такими как температура или наличие конкретного физиологического состояния, такого как острая фаза, определенное состояние дифференцировки клетки или только при репликации клеток. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая без ограничения Invitrogen, Clontech и Ariad. В данной области известны дополнительные примеры индуцибельных промоторов.

[0142] Примеры индуцибельных промоторов, регулируемых экзогенно доставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор металлотионеина (MT) овцы, индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); экдизиновый промотор насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad Sci. US.A. 93:3346-3351, 1996, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), систему с тетрациклин-зависимой репрессией (Gossen et al., Proc. Natl. Acad Sci. US.A. 89:5547-5551, 1992, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), индуцируемую тетрациклином систему (Gossen et al., Science 268:1766-1769, 1995, см. Также Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518, 1998, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), индуцируемую RU486 систему (Wang et al., Nat. Biotech. 15:239-243, 1997 и Wang et al., Gene Ther. 4:432-441, 1997, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки) и индуцируемую рапамицином систему (Marapi et al., J Clin. Invest. 100:2865-2872, 1997, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0143] Термин «тканеспецифический» промотор относится к промотору, который является активным только в некоторых определенных типах клеток и/или тканей (например транскрипция конкретного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регулирующие и/или управляющие транскрипцией белки, которые связываются с тканеспецифическим промотором).

[0144] В некоторых вариантах осуществления регуляторные и/или управляющие последовательности придают способность экспрессии тканеспецифических генов. В некоторых случаях тканеспецифические регуляторные и/или управляющие последовательности связывают тканеспецифические факторы транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом.

[0145] В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для кохлеарных волосковых клеток промотор. Неограничивающие примеры специфических к кохлеарным волосковым клеткам промоторов включают без ограничения: промотор АТОН1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор $\alpha 9$ ACHR и промотор $\alpha 10$ ACHR. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для кохлеарных волосковых клеток промотор, такой как промотор PRESTIN или промотор ONCOMOD. См., например, Zheng et al., *Nature* 405:149-155, 2000; Tian et al., *Dev. Dyn.* 23 1: 199-203, 2004; и Ryan et al., *Adv. Otorhinolaryngol.* 66: 99-115, 2009, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0146] В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для клеток уха промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для клеток внутреннего уха промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой характеристический фрагмент тканеспецифического промотора. Неограничивающие примеры специфических для несенсорных клеток промоторов внутреннего уха включают без ограничения: GJB2, GJB6, SLC26A4,TECTA, DFNA5, COCH, NDP, SYN1, GFAP, PLP, TAK1, IGFBP2, RBP7, GDF6, PARM1 или SOX21. В некоторых вариантах осуществления специфический для кохлеарных несенсорных клеток промотор может представлять собой промотор, специфический для поддерживающих клеток внутреннего уха. Неограничивающие примеры специфических для поддерживающих клеток внутреннего уха промоторов включают без ограничения: SOX2, FGFR3, PROX1, GLAST1, LGR5, HES1, HES5, неCH1, JAG1, CDKN1A, CDKN1B, SOX10, P75, CD44, HEY2, LFNG или S100b.

[0147] В некоторых аспектах селективный к клеткам промотор представляет собой селективный к клеткам уха промотор. В некоторых аспектах селективный к клеткам промотор представляет собой селективный к клеткам внутреннего уха промотор. В некоторых аспектах промотор представляет собой характеристический фрагмент селективного к клеткам промотора. В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к поддерживающим клеткам промотор. В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор.

[0148] В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к поддерживающим клеткам промотор. В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к волосковым клеткам промотор. В некоторых аспектах поддерживающие клетки выбирают из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hec), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc),

клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (КО), латеральных клеток большого эпителиального гребня (LGER) и клеток OC90+ (OC90).

[0149] В некоторых аспектах селективные к поддерживающим клеткам промоторы выбирают из одного или нескольких из GJB6, GDF6, PARM1, RBP7 и IGFBP2.

[0150] В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к медиальным поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор. В некоторых аспектах медиальные поддерживающие клетки внутреннего уха выбирают из одной или нескольких из латеральных клеток большого эпителиального гребня и клеток внутренней борозды. В некоторых аспектах селективные к медиальным поддерживающим клеткам внутреннего уха промоторы выбирают из одного или нескольких из GJB6, IGFBP2, GDF6, PARM1 и GFAP. В некоторых аспектах промотор представляет собой селективный к сенсорным эпителиальным поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор. В некоторых аспектах сенсорные эпителиальные поддерживающие клетки выбирают из одной или нескольких из внутренних столбовых клеток, наружных столбовых клеток, клеток Дейтерса и внутренних фаланговых клеток. В некоторых аспектах селективные к сенсорным эпителиальным поддерживающим клеткам внутреннего уха промоторы выбирают из одного или нескольких из GJB6, IGFBP2, RBP7, GDF6, PARM1 и GFAP.

[0151] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор GJB2. В некоторых аспектах энхансер/промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах энхансер/промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах минимальный промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах минимальный промотор GJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0152] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор GJB6. В некоторых аспектах промотор GJB6 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах промотор GJB6 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:

[0158] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор PARM1. В некоторых аспектах промотор PARM1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 40. В некоторых аспектах промотор PARM1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40.

[0159] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор LGR5. В некоторых аспектах промотор LGR5 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 55. В некоторых аспектах промотор LGR5 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 55.

[0160] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор представляет собой промотор АТОН1. В некоторых аспектах промотор АТОН1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 16. В некоторых аспектах промотор АТОН1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 16.

[0161] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор содержит GJB6 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор GJB6 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах GJB6 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0162] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор содержит промотор IGFBP2 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор IGFBP2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 95, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по

[0170] В некоторых аспектах селективный к поддерживающим клеткам внутреннего уха промотор содержит промотор PARM1 и минимальный промотор hGJB2. В некоторых аспектах промотор PARM1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 104, а минимальный промотор hGJB2 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах PARM1 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 104, а минимальный промотор hGJB2 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91.

[0171] В некоторых вариантах осуществления представленные AAV конструкции содержат промоторную последовательность, выбранную из CAG, CBA, CMV или промотор CB7. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, первая или единственная AAV конструкция дополнительно содержит по меньшей мере одну промоторную последовательность, выбранную из специфических промоторов улитки и/или внутреннего уха.

Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 10)

GTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCC
ACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGG
GGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG
GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTT
TTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGC
G

Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 11)

GTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCC
ACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGG
GGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTC
TTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGG
CG

Иллюстративный энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 12)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCC
CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT

TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
 GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCG
 GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCG
 GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

Иллюстративный энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 13)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
 CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
 TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCC
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
 TTATTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG
 CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCG
 GCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG
 GCGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

Иллюстративный энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 14)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
 CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
 TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCC
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
 TTATTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA
 GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCG
 GCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCG
 GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
 CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
 CGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC
 GCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCT
 CCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTG
 TCGTGCGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGG
 CGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCG
 GGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT
 GTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCC
 CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG

TGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGG
 CGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTT
 TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGC
 CGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC
 GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCG
 TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
 GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGCTCTAGAGCCT
 CTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAG

Иллюстративный энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 15)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
 CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
 TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCC
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
 TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG
 CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCG
 GCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG
 GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGC
 CTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA
 CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATT
 AGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAG
 GGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
 TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTG
 CGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCCG
 GGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGG
 GTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCC
 CCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCT
 CCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGG
 GGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCG
 CGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCC
 TTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGG
 AGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGG
 TGC GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCG
 CCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCG
 GGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGCTCTAGAG
 CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAG

[0172] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой

эндогенный энхансер-промотор АТОН1 человека, приведенный в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность АТОН1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 16.

Иллюстративный энхансер-промотор АТОН1 человека (SEQ ID NO: 16)

CTATGGAGTTTGCATAACAAACGTTTGGCAGCTCGCTCTCTTACACTCCATTA
ACAAGCTGTAACATATAGCTGCAGGTTGCTATAATCTCATTAATATTTTGGAACTT
GAATATTGAGTATTTCTGAGTGCTCATTCCCCATATGCCAGCCACTTCTGCCATGCTG
ACTGGTTCCCTTTCTCTCCATTATTAGCAATTAGCTTCTTACCTTCCAAAGTCAGATCC
AAGGTATCCAAGATACTAGCAAAGGAATCAACTATGTGTGCAAGTTAAGCATGCTT
AATATCACCCAAACAAACAAAGAGGCAGCATTTCTTAAAGTAATGAAGATAGATAA
ATCGGGTTAGTCCTTTGCGACACTGCTGGTGCTTTCTAGAGTTTTATATATTTTAAGC
AGCTTGCTTTATATTCTGTCTTTGCCTCCCACCCACCAGCACTTTTATTTGTGGAGG
GTTTTGGCTCGCCACACTTTGGGAACTTATTTGATTTACGGAGAGCTGAAGGAAG
ATCATTTTTGGCAACAGACAAGTTTAAACACGATTTCTATGGGACATTGCTAACTGG
GGCCCCTAAGGAGAAAGGGGAACTGAGCGGAGAATGGGTAAATCCTTGGAAGC
AGGGGAGAGGCAGGGGAGGAGAGAAGTCGGAGGAGTATAAAGAAAAGGACAGGA
ACCAAGAAGCGTGGGGGTGGTTTGCCGTAATGTGAGTGTTTCTTAATTAGAGAACG
GTTGACAATAGAGGGTCTGGCAGAGGCTCCTGGCCGCGGTGCGGAGCGTCTGGAGC
GGAGCACGCGCTGTCAGCTGGTGAGCGCACTCTCCTTTCAGGCAGCTCCCCGGGGA
GCTGTGCGGCCACATTTAACACCATCATCACCCCTCCCCGGCCTCCTCAACCTCGGC
CTCCTCCTCGTCGACAGCCTTCCTTGCCCCCACCAGCAGAGCTCACAGTAGCGAGC
GTCTCTCGCCGTCTCCCGCACTCGGCCGGGGCCTCTCTCCTCCCCAGCTGCGCAGC
GGGAGCCGCCACTGCCCACTGCACCTCCCAGCAACCAGCCCAGCACGCAAAGAAGC
TGCGCAAAGTTAAAGCCAAGCAATGCCAAGGGGAGGGGAAGCTGGAGGCGGGCTT
TGAGTGGCTTCTGGGCGCCTGGCGGGTCCAGAATCGCCCAGAGCCGCCCGCGGTCTG
TGCACATCTGACCCGAGTCAGCTTGGGCACCAGCCGAGAGCCGGCTCCGCACCGCT
CCCGCACCCCAGCCGCCGGGGTGGTGACACACACCGGAGTCGAATTACAGCCCTGC
AATTAACATATGAATCTGACGAATTTAAAGAAAGGAAAAAAAAAAAAAACCTGA
GCAGGCTTGGGAGTCCTCTGCACACAAGAACTTTTCTCGGGGTGTAAAACTCTTTG
ATTGGCTGCTCGCACGCGCCTGCCCGCGCCCTCCATTGGCTGAGAAGACACGCGACC
GGCGCGAGGAGGGGGTGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTGAGTGGCGCGTGCCGC
TTTTTAAAGGGGCGCAGCGCCTTCAGCAACCGGAGAAGCATAGTTGCACGCGACCT
GGTGTGTGATCTCCGAGTGGGTGGGGGAGGGTTCGAGGAGGGAAAAAAAAATAAGA
CGTTGCAGAAGAGACCCGGAAAGGGCCTTTTTTTTGGTTGAGCTGGTGTCCCAGTGC
TGCTCCGATCCTGAGCCTCCGAGCCTTTGCAGTGCAA

[0173] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный энхансер-промотор GJB2 человека, приведенный в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность GJB2 человек, содержащуюся в SEQ ID NO: 61. В некоторых аспектах промотор представляет собой минимальный промотор GJB2 SEQ ID NO: 91. В некоторых аспектах промотор является идентичным по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% SEQ ID NO: 91.

Иллюстративный энхансер-промотор GJB2 человека (SEQ ID NO: 17)

AAGCTTCGGTGAATTTAAACGTTTGGTGGCAGTGGGTCAAGTAGCCAGGCG
GCTGCGCTAGAGTACCCCGAAGGGACATCGGCGACACCACAAACCTCGCGCTGGCG
GCTCGCCCGCGCCTTTTTCCCTCCCGCGCGCGCCCGGCCCACTCGCACCCCGGGC
GGTGCCATCGCGTCCACTTCCCGGGCCGCCCATTCAGCTCCGGAGCTCGGCCGCA
GAAACGCCCGCTCCAGAAGGCGGCCCGCCCCCGGCCCAAGGACGTGTGTTGGT
CCAGCCCCCGGTTCCCGAGACCCACGCGGCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTCGCG
GTCCCTCCCGCGCCAGGTTCTTGCCGGGCGAGTCCGGGGCCGGCGGGCTCACCTGC
GTCGGGAGGAAGCGCGGGCGGGGCCGGGGCGGGGGTCTCGGCGTTGGGGTCTCTGCG
CTGGGGCTCCTGCGCTCCTAGGCGGGTCTTGCGCCGGGCGCCGCCGAGGGGCTCCG
AGTCGGGGAGAGGAGCGCGCGGGCGCTGCGGGGCCGCAACACCTGTCTCCCGCCGT
GGCGCCTTTTAACCGCACCCACACCCCGCCTCTTCCCTCGGAGACTGGGAAAGTTA
CGGAGGGGGCGGCGCCGCGGGCGGAGCGCGCCCGGCCTCTGGGTCTCAGAGCTTC
CCGGGTCCGCGAACCCCGACCGCCCCCGAAAGCCCCGAACCCCCCAAGTCCCCTTC
GAGGTCCCGATCTCCTAGTTCTTTGAGCCCCCATGAGTTCCCAAGTGCCCCCAGC
GCCCTGAGTCTCCCCCGGTTACCCCGAGCGCCGCCTCCCCAGCCCCTTGCGGGCCC
GGGTGAAGCGGGGGCGGCTGAGAGTCGGGACCCCCAGGAAGCGGCGCCCCAGAC
CCCGGCTCCGGCGCTGTGCCGTGGGCGGGGTTCAGGGATGGCTGTGGTCTGTTGCTCT
CTGTACTCCGCATAGTGCGAGAGGACTTGGCATTTATGAGCGCTTCTTTAATTTTTTA
TTGTTAGAGAAACAGGCATTCCTCCAAGGACTGAAGATCTGTTTCGAGTCGCGGAGG
CTGCGCGGGGCCCGCGAGGCTCTCGCAGGGGGACCTAGGCTGGGTGGCGGGGCGAGTG
CCCTCTGGAATGGGGGTAAACGGTGGCCGAGGAGGGGGCGCCGCTGGTGCCGGCGA
AGTCCCCGCTTCTTTCTCCCTCAAAATCTCACCAATCCGAACGAACGCCTTCTCGA
ATTTCCGATTTTATTCAATTACTTTCAACAATGTGCCAAGGACTAAGGTTGGGGGCG
GTGGGAGAGACAAGCCTCGTTTTTGCCATGGCCGGCAGGGGGGTCCCGCCATCTGC
GGAGGGTGCCCCCGCGGCCCGGCCAGCCAACCTCCTCCTTTTTCGCAACTGG
GGAAGTCAAGGAGGTGACTCCTTTCGGGGTGAGGAGGCCAGACTTTTCAGAAAG

GAAAGAGGGCAGGTAAAACCTGCCAAGCCCCTTCCTGCTCGATGCACACAGCACGA
AAGGGGGAAACTGATAGGATTCTGCGGAAGCTT

Иллюстративный промотор GJB2 человека (SEQ ID NO: 61)

AAGCTTCCGCAGAATCCTATCAGTTTCCCCCTTTCGTGCTGTGTGCATCGAGC
AGGAAGGGGCTTGGCAGGTTTTACCTGCCCTCTTTCCTTTCTGAAAAGTCTGGGCCT
CCTCACCCCGAAAGGAGTCACCTCCTTGCAGTTCCCCAGTTGCGAAAAGAGGAGGA
AGTTGGCTGGGCGCGGGGGCCGCGGGGGGCACCCTCCGCAGATGGCGGGACCCCCCT
GCCGGCCATGGCAAAAACGAGGCTTGTCTCTCCACCGCCCCCAACCTTAGTCCTTG
GCACATTGTTGAAAGTAATTGAATAAAATCGGAAATTTCGAGAAGGCGTTCGTTTCGG
ATTGGTGAGATTTTGAGGGGAGAAAGAAGCGGGGACTTCGCCGGCACCCAGCGGCGC
CCCCTCCTCGGCCACCGTTAACCCCCATTCCAGAGGGGCACTGCCCCGCCACCCAGCC
TAGGTCCCCCTGCGAGAGCCTCGCGGGCCCCGCGCAGCCTCCGCGACTCGAACAGAT
CTTCAGTCCTTGGAGGAATGCCTGTTTCTCTAACAATAAAAAATTAAAGAAGCGCTC
ATAAATGCCAAGTCCTCTCGCACTATGCGGAGTACAGAGGACAACGACCACAGCCA
TCCCTGAACCCCGCCACGGCACAGCGCCGGAGCCGGGGTCTGGGGCGCCGCTTCC
TGGGGGGTCCCGACTCTCAGCCGCCCCCGCTTACCCGGGCGCCCAAGGGGCTGGG
GGAGGCGGCGCTCGGGGTAACCGGGGGAGACTCAGGGCGCTGGGGGCACTTGGGG
AACTCATGGGGGCTCAAAGGAACTAGGAGATCGGGACCTCGAAGGGGACTTGGGG
GGTTCGGGGGCTTTCGGGGGCGGTTCGGGGGTTCGCGGACCCGGGAAGCTCTGAGGAC
CCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCCGCGCGCCGCCCTCCGTAACCTTTCCAGTCT
CCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACA
GGT

Иллюстративный минимальный промотор GJB2 человека (SEQ ID NO: 91)

AAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCCGCGGCGCCGCCCCCT
CCGTAACCTTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTAAAAGG
CGCCACGGCGGGAGACAGGT

[0174] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный энхансер-промотор SLC26A4 человека, приведенный в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность SLC26A4 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 54.

Иллюстративный энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 54)

CGGAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTT
CAGAACAATAACAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCTTCCTTCTGCCT
TTCATCTTAACCATGCATTAGTTTTAACAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACAC
TGATGAGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGT

AGTCCAGTTTATTCCCTTCCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGA
GTCTAGTGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAAA
CACACACACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAAGTC
TCTGTATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTCAAGGACTT
ATTAATATAGAAACCTGGCCATTGTTCCCTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCA
CCTGTGGCAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTCTTCCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTC
TTTAAGGAGTCCCACAGGGCCTGGCCCCGCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGT
AACGGGATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAG
CCTTCCCGGTTCTGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCCTGAT
AGGATCGGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCTTCGACCAAGGTGTC
TGTTGCTCCGTAAATAAAACGTCCCCTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGG
AAGGGTAGTCCGCGGGGCATTCCGGGCGGGGCGCGAGCAGAGACAGGTGAGTT

[0175] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный энхансер-промотор LGR5 человека, приведенный в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность LGR5 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 55.

Иллюстративный энхансер-промотор LGR5 человека (SEQ ID NO: 55)

AGGGCTATTTGTACCTCAACGAGGGCTTCTCTCCAAGAAAGCCCTGAATCCTT
TTCCTCCTTTTTCTCTGCAGATTCATATAGGACACTTTTTGAAGCAAGAGCATGCATT
TTCCCCCTGGCGCTCTGCAGCGGTTCTCAGAGCCCAGTGTCACTCACATAGGTGGGA
CTGCTCTCAGTTCAGAGAGCGCTGGGACACTTAAGATGAAAAGTCCCTGGAAGTTA
GCAAACAGCCATCTGTCACTCTGGCATCGATTTACTAAAAGTGACTTCTAGGGTATT
CTAAACCACTTTTAAAAAACAATGAGTCACTTCGACTTCCTCACCCCGCAAGAGAT
AGGAAGGCAGCAGTGGAGTGCTCGCTCAGGAGCTGTATTTGTTTAGCGATTAGCCTA
GAGCTTTGATTTTAGGGCAAAAGCGAGCCAGACAGTGCGGCAGACGTAAGGATCAA
AAAGGCCACCTATCATTCGCCGGGGACGCCTGCCTCCTTACCCTGATAACGTAAC TA
TTTCTCTGCATAGGATTTTAGTTTTTGTGTTTTTGTGTTTTGTTTTATTCTGTTTAATCACT
TCAAGTATCTCATCCATTATTTGAAGCGGGCTCGGAGGAAACGTGCCGCATCCTCCA
GTCCTTGTGCGTCTGTTTAGGTCTCTCCGAAGCAGGTCCCTCTCGACTCTTAGATCTG
GGTCTCCAGCACGCATGAAGGGGTAAGGGTGGGGGGGTCCCCTATTCCGGCGCGCG
GCGTTGAGCACTGAATCTTCCAGGCGGAGGCTCAGTGGGAGCGCCGAGAACTCGCC
AGTACCGCGCGCTGCCTGCTGCCTGCTGCCTCCCAGCCAGGACTTGGGAAAGGAG
GGAGGGGACAAGTGGAGGGGAAAGTGGGGCCGGGCGGGGGGTGCCTGGGAAGCCAG
GCTGCGCTGACGTCAC TGGGCGCGCAATTCGGGCTGGAGCGCTTTAAAAAACGAGC
GTGCAAGCAGAGATGCTGCTCCACACCGCTCAGGCCGCGAGCAGCAGCAAGGCGCA

CCGCCACTGTCGCCGCTGCAGCCAGGGCTGCTCCGAAGGCCGGCGTGGCGGCAACC
GGCACCTCTGTCCCCGCCGCGCTTCTCCTCGCCGCCACGCCGTGGGGTCAGGAACG
CGGCGTCTGGCGCTGCAGACGCCCGCTGAGTTGCAGAAGCCCACGGAGCGGCGCCC
GGCGCGCCACGGCCCGTAGCAGTCCGGTGCTGCTCTCCGCCCGCGTCCGGCTCGTGG
CCCCCTACTTCGGGCACCGACCGGT

[0176] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный энхансер-промотор SYN1 человека, приведенный в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность SYN1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 56.

Иллюстративный энхансер-промотор SYN1 человека (SEQ ID NO: 56)

TGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTG
CCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTTCCCAA
ATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGT
GCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGC
GCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTCGCCGGTCCCCCGCAA
ACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGGCCAGCCGGACCG
CACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGC
CGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGTGCC
TGAGAGCGCAGTCGAGAA

[0177] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный энхансер-промотор GFAP человека, приведенный в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления энхансерная-промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной-промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность GFAP человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 62.

Иллюстративный энхансер-промотор GFAP человека (SEQ ID NO: 57)

CCCACCTCCCTCTCTGTGCTGGGACTCACAGAGGGAGACCTCAGGAGGCAGT
CTGTCCATCACATGTCCAAATGCAGAGCATACCCTGGGCTGGGCGCAGTGGCGCAC
AACTGTAATTCCAGCACTTTGGGAGGCTGATGTGGAAGGATCACTTGAGCCCAGAA
GTTCTAGACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGACCCTATCTCTACAAAAAAGTTAAA
AAATCAGCCACGTGTGGTGACACACACCTGTAGTCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAG
GTGAGGGGATCACTTAAGGCTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGTCGTGGTTGCGCC

ACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGTGAGACCCTGTCTCAAAAGACAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAG
 GCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTT
 GTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCAT
 GCCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCC
 TGCTTCCCGCCGCACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAG
 GGGGCTTGCAATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCAC
 AGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCT
 CTATTCAGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGG
 GTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATG
 GGTGAGGGGACTGGGCAGGGTTCTGACCCTGTGGGACCAGAGTGGAGGGCGTAGAT
 GGACCTGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGCCCAGGTCTCAGGCTCCTAGTTGGGCCC
 AGTGGCTCCAGCGTTTCCAAACCCATCCATCCCCAGAGGTTCTTCCCATCTCTCCAG
 GCTGATGTGTGGGAACTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACGGAGGGGTGGCC
 AGGGAAACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGT
 AACGGCTTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCC
 AGACAAGGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAG
 GCAAGAGAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGC
 CATGATTGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATCCCAGCCCCCAGCCCCAGAA
 CTCCAGGGAATGAATGGGCAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCAAGGGAA
 GGACTCCAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAAATGAGGTGGCCCTTGAG
 GGTACAGAACAGGTTCAATTCTTCGCCAAATTCCCAGCACCTTGCAGGCACTTACAGC
 TGAGTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGT
 CATCTGGTACAGCCCTTCCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTC
 TCTGTTGCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTACTGG
 GCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCC
 ACCCCACTCAGCCCTTTCCTTCCTTTTAAATTGATGCATAATAATTGTAAGTATTCAT
 CATGGTCCAACCAACCCTTTCTTGACCCACCTTCCTAGAGAGAGGGTCCTCTTGCTTC
 AGCGGTCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAG
 GAGTTGGCGTGCCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAG
 GGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCCTCAGGCTATGCCAG
 GGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCC
 CTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCT
 CCGCTGCTCGC

Иллюстративный энхансер-промотор GFAP человека (SEQ ID NO: 62)

GAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGG
 CCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAG
 CAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAGTGA
 ATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCTTCCCGC
 CGCACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGC

ATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCCCTA
 GGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCAGC
 CTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGG
 GGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGAGG
 GGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCTCAGGCTATGCCAGG
 GGGTGTGTCAGGGGACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCCC
 TCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTC
 CGCTGCTCGC

[0178] В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор GDF6 человека, приведенный в SEQ ID NO: 90. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 90. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную последовательность промотора GDF6 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 90.

Иллюстративный промотор GDF6 человека (SEQ ID NO: 90)

CCACAGGTAACCTCCGTCGGCGTCCACAGGGGGGCAGGAGATACCATACTGCA
 CAGTTGTACGTCTTCCATCTGTTTGGTGTAGAAAAATCTAACCACTACAAGAATGCC
 ACGGGCACTGTGGCAGACAGAAGCAGCGCTACGCCGCATCGCCTTTCAGCGTGCAG
 GCCCAGGAATGAGCGAGGCAGTGGGCGGGGAAGACAGGCACGGGGAATCTGGGGA
 CAGATAAAGGAACTCGTGATGGGGCGAGGCTGGGCTGAAGAGAAACAGATTGGG
 GTAGAGCTGCAAAGGGAGGGGTCCACTGGAAGGCGAGGGGGGAGGCCGGGAAGAG
 AGAGGGTGGGAAGGCAGTGTGAGATGGGAGGGCAGTGTGAGAAGAAAAGCAGGCT
 GGGGAAGAGGGATTGGAATGCAGAAGGAACTTGGGGAAGGAGGAAGTCCTGCAGG
 CGGGAGGGAAAGAAGAGAGGGGGAGCAGCTAAAGTCTGCGTCAGAAGAGGTTGGG
 GACTGCGAGAGGAGAGGCTGGGGCCTGCAGGGGAGCGCAGCAGCTTTTAGCATCGA
 TCCAAACTCTAAAGACTCGTGGCCTTTGCCTGACCTCGAGGGTCGGGAATAGACGCC
 TGTCTTTGTGGAGAGCGATACCCAACCGAGAAAAATGGGGCTGTTCCGAGCTGGGCC
 CTGCGCCTGGCCAGGGCGAGGCTTCTCTGGCTCCGGGCTGGCCCCCTGAGGGGCAG
 CACGCAGCCTGCAGCAGAGGCGCCTGCTCCAAGCTGTCTCTTGGGGGCGCCGCCGC
 CGCTTCCCTCCTCCGGGGCCGCTCGCTCCCAGGAAAGTGGAGGCGGCTGGCGAGGA
 CCGAGAGCCGGGGCCGCGCTGCGGAGGGACCACACCTCCGGGAGTTCGAGGGGGA
 CCCTGGCGCGGGCGGGCCAGCCTTTCGGGGCCGGCAGCGCCCGCCTTCCCCCGGTGAGC
 GCTTGCGGCCCCGCGCCGCGCGCACCGCCCGGCAACCCCGCGCGCGTCCCGCGGGGG
 CGCTGCGTCTTCTGCCACACCGGCGCACCGCGGGCCCTCTCCCCACACCTCCGGC
 CCGCACCAACCGGCTCTCCTCCCACCTCCCCACCCCTCCTCTGCCCTCCCTCCCCAT
 TCCTCCCCTCCCGGCGAGGGGGCGGGAGGGGGCGTGGCGGGGGCCGGGGTTTGTGTGG
 CTGGGACCCGGCTCCTC

[0179] В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор IGFBP2 человека, приведенный в SEQ ID NO: 95. В некоторых аспектах промоторная

последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 95. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность IGFBP2 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 95.

Иллюстративный промотор IGFBP2 человека (SEQ ID NO: 95)

AAGAAACTTGCCCGAGTTTACACAGCTAGTAAATGGTTGCATTAGTCAGGAC
AGCTAGCCTATATTACAATAACAACCCTCTCAAATCCTAATGGCTTAAAACAACAGA
GGTTTAATTTATACTCATTAGCTGTTCAAGGCAGGAGGCTCTATTCTCTAATCCATAC
AGTCACTCAGGATCCAGGCTGGTGGAGACCCTGCCATATTGTAGCCTCACCATTAA
AACATGAAGAAGATAGAAAGTGAGGAGTCATGTAGGTTTTGTTCCGTTGCCTCAGG
CTAGGAGTGACAGGTCACCTTCATCTCACTCACAGCTCACTGCCCACAACCTAGTCACT
TGTGACTGTGCGAGTTAAGCTTCTGTGTGTGAAGGAAGGAAAAGAGAATGGGATAA
AGGTGAACATCAGCAGGCTCTACCACAGTAGTTTGAACCAAGACTTGAGCCTAGGT
CATGTGGCTTCAGAATCTTTGCTCTTAATCACACTAAACAGCCTCTGTAAGTCATCTT
TCCTTCATCCAGTGCCTAAGAACATGCAGTCCAATGCCCTCATCCTTCAGAAGAACT
TGAGTGAACCTCAGAGAAATTGAGTAGAGTGCCACAGCATGCCCAAGGCCACACACC
CTGAGGTTGGCAGTAGGTCCTGAGTTAGAGTTGTCATTTCTTGGCTCCCCTGGTAGT
AGTGGAAGGTAAGGTTTTGACATACTAGTTGGATGACCACGGGCAGGTCACCTAA
ATTGTCTAAGCATCGTTTGACCCTTGTAAGAATTAATGAAATAGCACCTGTAAAAG
TGTCTGCACGGACTIONACTGCTGTTAGTTTTGTTCTTTCTTCTCTGTTGTCACCTGCACTT
CCCTGCCTGTTACCCAGGCCATGCAGACCAGCCAGGCCTTCGACTTACAGTGCGGAT
AAGATTCCAAATCTCCACGGCTGGTTTTCCATGCTTTCTTCCAGGCTTCTGAGGACCCT
GTGCTCTGGTTTCTTCTATTTCTTTTCTATTACTTTTCTGTTACTCTTGAGCACACTTG
CTGGAAGCAATATGCATCCAGTTCTCCCTCTCTTGCCTCATTACACTTTGCAGAACA
ACTCCAATCCCTTCCAACCAAGTAGTCCCTTTGAATTTCTTGTCACCCAAGGAATCTC
TCTGACAGGGGTCTTTGTTAGGGTCACACCCCAGGAGATGGTTGATTATGGCTGAGT
CCAGCCTGGAATGATGGGGGTGGGGGCAGCTTGGGTAGATGACTCAGTAAATCAA
ACAGAACAATGAAAGGAGGTCATGCTTGTCCATCTGCATTATTGAAGACAGCCATA
AATGGCCTTACCCAGAGCGGGTCTGTACACCTGGAGAGCTGATCTGACCTCTCCA
AGACCCCTGCAACTGAGTGTTCTGGGATCTGTCCTGCAACAAGTGCCTCGAGATTTG
TAGGTGGGGGCCAGAGGGAGGGGGTCTGCAGACGAAGGGGGCAGGTTTTGCGGG
GCACTTAGGGTTCTCATAGGTTGTAGTCACGAGCTCC

[0180] В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор RBP7 человека, приведенный в SEQ ID NO: 98. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 98. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную энхансерную-промоторную последовательность RBP7 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 98.

Иллюстративный промотор RBP7 человека (SEQ ID NO: 98)

CCCATGGCTCTGTAAAAATCAAAGAAACATCTTTTCCAACAGCCCTTTCAAAC
 TCCTCATCGCATCTCACTGGCTGATTCAATTTAAACCTGCTTCTCCCTAAAGCTG
 ATCACTGGCTAAGCTAATAGGGTTTCCGGGATTGGTTTAGCCTGATACTAATCCAGG
 TCTACCTTCAGGAGCCAGACCAAACCTGCCTATTGGCATTGCATTCTTGCAGTAGGGA
 GGGGAGGTATGGATGGTGTGGAGTCCACCACAAGGTCCATGCCAGTCTTTGCTGAA
 CCAGCATCAGACTCCATCAAGCAACAGATGAGAGGTTCCATGATAAAGTGGCCCTC
 AGCAATCCCCATCCATTGCTGTCTAGGAAGAACAGTGCTTGTACACAGGTTTAGGAC
 CTCAGTCTTGGCTGTAATCTTCTGGTTTACTTTGCCAGCACCAAACAGAAGGAAAGA
 AAGGGCTCAAATTTGACCAAATAAATTATGCTTCTCCTTCCAGAGATAACCTTGAGT
 CCTGTCTAGGAAGATATTAGAATTGTAAAGAAAAAATAATTACTCCTTATCCTATG
 GCAAGTGGAGTCTATGTCTACTTCAGCTGAAATTAAATCCTGTCCATAATAGATGAC
 CCTTGCTCAAGCTGGCCAGAAGCCATACCAACCAGCACGAAGGTAAAACTATTATT
 AGTTTTTTCTGTGATTTTCATTTTCAGGCCAAGTTTTAGAACATAAGATTTTAAGAA
 TAGGAAGTAAGTAAGATTTCTGCATATCCTGTTCTCTTAGTCAGCTGAATTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTAGTCCTAACTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCAC
 CGCACCAAGCCTGGAATCTATGTCTTACAGTTATGAGAATCAACAGCTAGCTCATTA
 TGGGCAAGGTGATGTCACTCTGGCTTCTCAATGAAAATGGCATTCTCCCTTGGA
 AAGTCATAGCCAGTCAGTCAGTCAGTCACGGGAGCGCAGCGGCTTCTAGGGGTGAG
 TGGGACCCACGCGGCCCCACCTGCTCCTCCCGCGCGCGGCCCCACCCCCCTGCCCCG
 CCCCCGCTGGTTTATAG

[0181] В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор GJB6 человека, приведенный в SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную промоторную последовательность GJB6 человека, содержащаяся в SEQ ID NO: 101.

Иллюстративный промотор GJB6 человека (SEQ ID NO: 101)

AAATAGCTTCCAACGTTTCCACCCACCAGCCCTTGCACCACTCCCTGTACTG
 GCCCTGAGCTTTCTAGTCTTGAAGTGAAGCGGGGAGGCAATGTGGTCTCTCCTGGT
 GCACTGTCCCGAGGAAGGCCTGCTCCGCTTCCCCGGAGGAGTCTTCAAAGGATGGA
 GGTAATTAATAAAAAACAACCCCTGTACCTCCTCTAAGTGGTCATTAATTAATAAAGA
 ACCTCCAGGCTCCTATAGGAGAGGTCTGTGCACCCCGCGGGCTATGAGAAGGCTGG
 ATCACCCAGAAAGACTGAGGATGTGTCTTGGCAAAAACACAGCCTGCCCTCACAC
 TGCTCCCCACGGGTGCACTAGGGAGGAAGAGTTCCTCGAGGGCCTGAGCAGGCGC
 CCCACACCTGCACCCGTGCAGAGGGGGCTGGGCCCCGCCCTCTGCGCTCCCGAGGGA
 GAGCCCTACCCCTGCATCCCCGGTACCCCGTTCCCTCCAAGGGCCGGAAAGAGGG
 CCCCAGCACTGTGCACTTCTTAGGGGTCCCCCACCCTGCGCCCCCGCCACGGGAAA
 AAGGTCCCCGCTCTGCGCATCCGGCCCCGGAGGGACAGCCCCGGTCCTGCACTCCTT

GCTCCTCAGGGGGACGGTCCGCGCCCAGCGGCTAGTGCGCCCCGGGTAGGTGGGGG
CGGGGGGCTCGTCGAGTGACAGCGCTCGCCTCCCGCAGCCCGCCCGAGCCGCGTCA
GGGCAG

[0182] В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенный промотор PARM1 человека, приведенный в SEQ ID NO: 104. В некоторых аспектах промоторная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с промоторной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 104. В некоторых аспектах промотор представляет собой эндогенную промоторную последовательность PARM1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 104.

Иллюстративный промотор PARM1 человека (SEQ ID NO: 104)

TGTACAGGAGATAGTCAGGGAATTAGTAATTTTCAAAGAGGTGACTTTGAAT
TCAAACCTTAAATATCATCTTCAGCTGAAACAAAGAAGGGGTGCAGTTATGAGGAAG
TGACCAGGTAAAGCATGGCAAACAAAGGTAAAGTTTGTATGCGTATTTAAGTCAG
AGCCCTCTCCATTGATAAGAGTTTCCAGTAATTTAGTGCCATCCTTTTCTTGCTATAG
AGTTCTCGTCTCTATCTGAGCACGCAAAAATAACATGCTTTCTTGCTTTCTTGAAGTT
GGGCATGGCCATTGACTTGCCTTAGCCCATATTTTCTGTGAAGTGGTCTTCAAAAA
CCTATATTTCTGCCATAGAGTCACTTACTTAACCTGCCCTATTTAAAGGGGCTAATGC
CTGATAGAATGTCGCTGCATAACTCCATCTGTGTGTGGTCCCTGCATCCATGACAAC
CAAAACCCAGATGCAGAAATTGTTCTTAATCACATAGATTACCCTAGAAACCGGAA
GGGCCTTGAAGTCAAAGCATTCAGAGAACATGCTGAACAAATTGAATTTGCAGTT
TATCTGGCCAGGGAGGATGGAGAGGGGATGGGCACTTGGTCTGAGTATTTTTTGT
CTCATTCCAACAGAAATTACTAGATTTACCAAAAAATCTACAAGTGGTAGTGTGATA
GAGTCAGGCAGAGGAATTGACCATAGATAAGGTGCTCAGGACTCCTAGAGTCAGCT
TCTGGTATGTGAGAAAGAAGTGAGAACAGAGCCCATGGCATATGAAGAAGATATTA
CAGAAAAAAGAAAGCTGCCTTCCACGCAAATCATTTCTTTACAAAGGCTTGTTAACT
CCTGCAGTGCCAAGAAGCTGAATGCAGCGGCAGACATCCTGGTTCGGGCCCCAGGA
AGCTCAGCCGGGTTTAATGTGGATGAGGGTTTAATGATGTACACGCAGAAGTGTTTT
GACAAATGAAGAAGGTCCTCATTCTTGGAACATGTGCCGGTTCTCCGAGGGAACTCC
TAAAAGGCTGTAAGCTCATGTAGGAAAAGCTGAGCTAGATTCTTAAGGGCAGAGAT
GTGCTCACATTTCTTTGCATCCCTAGTTCCCAGCACAGTGCAAGGCGCTGCAAACAT
TTGCTGAACCCAGGGTCTCGTGTCTTGAAGTGTCCAGCAGAGGCCGCTCTGGGCCGGG
GCTCTCGGGACCTGAGGGCTGAGAGAAGGAAGGCCAGGGGGTGGCCAGTCATCGC
CGCGGGGCCCCGGGTGGGAGGGGTTTGGCAGCGGCAGGCGCGGCGGCGGCGGCGGA
GGCGGAGGCGGCCCCGGG

Энхансеры

[0183] В некоторых случаях конструкция может содержать энхансерную последовательность. Термин «энхансер» относится к нуклеотидной последовательности, которая может повысить уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок (например белок коннексин 26). Энхансерные

последовательности (обычно длиной 50-1500 п.н.) обычно повышают уровень транскрипции за счет предоставления дополнительных сайтов связывания для белков, связанных с транскрипцией (например факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность находится внутри интронной последовательности. В отличие от промоторных последовательностей энхансерные последовательности могут действовать на значительно большем расстоянии от сайта начала транскрипции (например по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и/или энхансер SV40. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит химерный интронный энхансер, приведенный, например, в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит энхансер GJB2, приведенный, например, в SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления полученный из SV-40 энхансер представляет собой интронную последовательность SV-40 Т, которая приведена, например, в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с энхансерной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19.

Иллюстративный энхансер CMV (SEQ ID NO: 18)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC

CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG

Иллюстративный энхансер CMV (SEQ ID NO: 63)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT

Иллюстративный синтетический интрон SV-40 (SEQ ID NO: 19)

GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCG
CCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCC
CTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTG
GCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGC
TCGGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGCGGGAGCGCCGCGTGCGGGCCCGCGCTG
CCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG
GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGC
GCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGG
CCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGG
GCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCGCCTCGGGCCGG
GGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGC
GCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACT
TCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTC
TAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAG
GGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTC
CGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGG
CGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCC
TACAG

Иллюстративный химерный интрон (SEQ ID NO: 64)

GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCG
CCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCC
CTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTG
GCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCAT
GCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG

Иллюстративный энхансер GJB2 (SEQ ID NO: 65)

CTTCTTCTGGAGTCTTTTCTGGAATAATTCTGGGAGTGGGCTCAGCCTGCGGG
AGAGTAACATTTTATAACTTGATAGATGTAGCTGAGATGCCTCCCAGAGGGGAGA

CCCGCCTCTCCTCCGGCAGCTGTGCACGTAGGCTTGTTCACAGCAGCCTGGCCAGGG
 TGGTCCACCTGGTGTCTTCTCATCTTCTTTCCCGGAGCGCTGACTCCTGCGCGTCCTC
 TTGGAAGACTCTTGACAGGACGGGTGTTTTATGGGTGTGATTCAGTGTCTCTTTGCA
 TCAGTTCAATGTGGTGGTGTTCATCAACCCTTGTAGCGTTAGCAAAATTTGCTCAA
 GTCATTCGCGCAGGAATGTCTGTGTCTTGCTTCCAAGAAAGCTTGTAAGTGCCGGCAA
 CAGGCCAAGCAGCTCACAAACCTGACCACAAGCCTGTGAGTAATTGTGGGGCAGCA
 CTTAGCAGTCTTTTATTTTCGACTTATTAAGTCTCATCTTGGCCTCACCTTCTCCCTG
 GAAGGTGGCGTGGGTGGGAACCACTGGGTCAGATCTTTTTTACCCTTGCCGTGGAGC
 CAGTTTCCTGTTGCATGTGGGGGAAGCAACATGTGGTGAAGAGTATAGAAAACGAA
 AACATGTGGGTACAGTATGTATAAGTGGAGGGAACAACTCATAATTCCAACCTAGT
 TTCTCATGAGAGACTCATGAATCATTGTGGTAGTTCTCAATATAAACTTAATCTAGG
 CCGGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCTCAGCACTCTGGGTGGATCACTTGAGGTC
 AGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACATGGAGAAACCCCATCGCTACTAAAAATAC
 AAAATTATCCAGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAG
 GCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGACCAACATGGAGAAA
 CTGTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGACGCATGCCTGTAATC
 CCAGCTATTTGGAGGCCGAAGCAGG

Фланкирующие нетранслированные области, 5'-UTR и 3'-UTR

[0184] В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может содержать нетранслируемую область (UTR), например 5'-UTR или 3'-UTR. UTR гена транскрибируется, но не транслируется. 5'-UTR начинается на сайте начала транскрипции и продолжается до инициаторного кодона, но не включает инициаторный кодон. 3'-UTR начинается непосредственно после терминирующего кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Регуляторные и/или управляющие компоненты UTR могут быть включены в любую из конструкций, композиций, наборов или способов, описанных в настоящем документе, для усиления или иным образом модулирования экспрессии белка коннексина 26.

[0185] Натуральные 5'-UTR содержат последовательность, которая участвует в инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR может содержать последовательности, такие как последовательности Козака, которые, как известно, обычно участвуют в процессе, в котором рибосома иницирует трансляцию множества генов. последовательности Козака имеют консенсусную последовательность CCR(A/G)CCAUGG, где R представляет пурин (А или G) за три основания перед инициаторным кодоном (AUG), а за инициаторным кодоном следует еще одно «G». Также известно, что 5'-UTR образует вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

[0186] В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR включена в любую из конструкций, описанных в настоящем документе. Для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, можно использовать неограничивающие примеры 5'-UTR, включая 5'-UTR из следующих генов: альбумин, сывороточный амилоид А, аполипопротеин А/В/Е, трансферин, альфа фетопропротеин, эритропоэтин и Фактор VIII.

[0187] В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR из мРНК, транскрибируемой клеткой в улитке, может быть включена в любые из конструкций, композиций, наборов и способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR получена из локусов эндогенного гена GJB2 и может содержать всю или часть эндогенной последовательности, приведенной, например, в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-UTR имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью 5'-UTR, представленной в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 66.

[0188] 3'-UTR находятся непосредственно 3'- от терминирующего кодона представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR из мРНК, транскрибируемой клеткой в улитке, может быть включена в любые из конструкций, композиций, наборов и способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR получена из локусов эндогенного гена GJB2 и может содержать всю или часть эндогенной последовательности, приведенной, например, в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-UTR имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью 3'-UTR, представленной в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR получена из локусов эндогенного гена GJB2 и может содержать всю или часть эндогенной последовательности, приведенной, например, в SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-UTR имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью 3'-UTR, представленной в SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68.

[0189] В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать неэндогенную регуляторную область. В некоторых вариантах осуществления UTR, которая содержит неэндогенную регуляторную область, является 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления UTR, которая содержит неэндогенную регуляторную область, является 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления неэндогенная регуляторная область может быть мишенью по меньшей мере одной ингибирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию и/или активность гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой короткую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (миРНК), антисмысловый олигонуклеотид, направляющую РНК (gRNA) или рибозим. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой эндогенную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет

собой неэндогенную молекулу. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота демонстрирует тканеспецифический профиль экспрессии. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота демонстрирует клеточно-специфический профиль экспрессии. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота экспрессируется в волосковых клетках внутреннего уха (например ИНС и/или ОНС). В некоторых аспектах ингибирующая нуклеиновая кислота экспрессируется в волосковых клетках внутреннего уха, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации. В некоторых аспектах ингибирующая нуклеиновая кислота уменьшает, подавляет, ингибирует или устраняет экспрессию коннексина 26. В некоторых аспектах ингибирующая нуклеиновая кислота уменьшает, подавляет, ингибирует или устраняет экспрессию коннексина 26 в волосковых клетках внутреннего уха, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации.

[0190] В некоторых аспектах ингибирующая нуклеиновая кислота уменьшает, подавляет, ингибирует или устраняет токсичность, связанную с экспрессией коннексина 26. В некоторых аспектах ингибирующая нуклеиновая кислота уменьшает, подавляет, ингибирует или устраняет токсичность, связанную с экспрессией коннексина 26 в волосковых клетках внутреннего уха, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации.

[0191] В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать более одной неэндогенной регуляторной области, например две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять регуляторных областей. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать четыре неэндогенных регуляторных области. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать более одной неэндогенной регуляторной области, причем по меньшей мере одна из более, чем одной неэндогенной регуляторной области не такая же, как по меньшей мере одна из других неэндогенных регуляторных областей.

[0192] В некоторых аспектах раскрытие относится к конструкциям, содержащим регуляторный сайт-мишень микроРНК (miRTS), который можно использовать для регулирования (например уменьшения) экспрессии коннексина 26 в клетке (например в клетке внутреннего уха, например в волосковой клетке). В некоторых аспектах конструкции обеспечивают пониженную токсичность, что может быть связано с экспрессией коннексина 26 в некоторых клетках (например в клетках внутреннего уха, например в волосковых клетках).

[0193] В некоторых вариантах осуществления неэндогенная регуляторная область,

включенная в UTR, может содержать регуляторный сайт-мишень миРНК (miRTS). В некоторых вариантах осуществления miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-182 человека. В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-182. В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-182. В некоторых вариантах осуществления более одной последовательности-мишени миРНК-182 могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-182. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-182. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-182 могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 78.

[0194] В некоторых вариантах осуществления miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-183 человека. В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-183. В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-183. В некоторых вариантах осуществления более одной последовательности-мишени миРНК-183 могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-183. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-183. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-183 могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79.

[0195] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-194 человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-194. В некоторых аспектах UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-194. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-194 могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-194. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-194. В некоторых аспектах более одной

последовательности-мишени миРНК-194 могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 107.

[0196] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-140 человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-140. В некоторых аспектах UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-140. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-140 могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-140. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-140. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-140 могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-140 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 108. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-140 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 108.

[0197] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-18а человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-18а. В некоторых аспектах UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-18а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-18а могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-18а. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-18а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-18а могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-18а содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 109. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-18а содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 109.

[0198] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-99а человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-99а. В некоторых аспектах UTR может содержать

более одной последовательности-мишени миРНК-99а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-99а могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-99а. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-99а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-99а могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99а содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99а содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 110.

[0199] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-30b человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-30b. В некоторых аспектах UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-30b. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-30b могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-30b. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-30b. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-30b могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 111.

[0200] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень миРНК-15а человека. В некоторых аспектах UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-15а. В некоторых аспектах UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-15а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-15а могут быть рассредоточены в нескольких местах в UTR. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать всю или часть последовательности-мишени миРНК-15а. В некоторых аспектах 3'-UTR может содержать более одной последовательности-мишени миРНК-15а. В некоторых аспектах более одной последовательности-мишени миРНК-15а могут быть рассредоточены в нескольких местах в 3'-UTR. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15а содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 112. В некоторых

аспектах последовательность-мишень миРНК-15а содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 112.

[0201] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в специфических клетках внутреннего уха. В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации.

[0202] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в волосковых клетках ушей, представляют собой miR-194, miR-140, miR-18a, miR-99a, miR-30b, miR-15a, miR182 или miR-183. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-194. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-140. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-140 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 108. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-140 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 108. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-18a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-18a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 109. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-18a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 109. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-99a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-30b. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-15a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 112. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 112. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-182. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-183. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79.

[0203] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в клетках спирального ганглия. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в клетках спирального ганглия, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в клетках спирального ганглия, являются miR-194, miR-18a, miR-99a, miR-30b, miR-15a, miR182 или miR-183. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-194. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-194 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 107. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является

[illegible]

[0204] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для мРНК, которая экспрессируется в клетках базиллярной мембраны. В некоторых аспектах

миРНК, которая экспрессируется в клетках базилярной мембраны, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в клетках базилярной мембраны, являются miR-99a, miR-30b и miR-15a. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-99a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-30b. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-15a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 112. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 112.

[0205] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в латеральных поддерживающих клетках. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в латеральных поддерживающих клетках, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в латеральных поддерживающих клетках, являются miR-99a, miR-30b и miR-15a. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-99a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-99a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 110. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-30b. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 111. В некоторых

аспектах последовательность-мишень миРНК-30b содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 111. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-15a. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 112. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-15a содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 112.

[0206] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в медиальных поддерживающих клетках. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в медиальных поддерживающих клетках, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в медиальных поддерживающих клетках, являются miR182 и miR-183. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-182. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-183. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79.

[0207] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в клетках спирального лимба. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в клетках спирального лимба, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в клетках спирального лимба, являются miR182 и miR-183. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-182. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосковых клетках ушей, является miR-183. В некоторых аспектах

последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79.

[0208] В некоторых аспектах miRTS может быть последовательность-мишень для миРНК, которая экспрессируется в клетках внутренней борозды. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в клетках внутренней борозды, уменьшает, снижает или подавляет экспрессию белка GJB2 (коннексина 26). В некоторых аспектах миРНК, которые экспрессируются в клетках внутренней борозды, являются miR182 и miR-183. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосяных клетках ушей, является miR-182. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-182 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 78. В некоторых аспектах миРНК, которая экспрессируется в волосяных клетках ушей, является miR-183. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 79. В некоторых аспектах последовательность-мишень миРНК-183 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 79.

[0209] В некоторых вариантах осуществления неэндогенная регуляторная область, включенная в UTR, может содержать множество регуляторных сайтов-мишеней миРНК (miRTS). В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать по меньшей мере один сайт-мишень миРНК-182 и по меньшей мере один сайт-мишень миРНК-183. В некоторых вариантах осуществления неэндогенная регуляторная область, включенная в UTR, представляет собой дестабилизирующий домен и приведена, например, в SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления UTR может содержать последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с неэндогенной регуляторной областью, приведенной, например, в SEQ ID NO: 80.

[0210] Известно, что 3'-UTR имеют встроенные в них участки аденозинов и уридинов (в виде РНК) или тимидинов (в виде ДНК). Эти богатые AU профили особенно распространены в генах с высокой скоростью метаболизма. На основе особенностей и функциональных свойств их последовательностей богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., Mol. Cell. Biol. 15:5777-5788, 1995; Chen et al., Mol. Cell Biol. 15:2010-2018, 1995, каждый из которых полностью включен в настоящий документ

посредством ссылки): ARE класса I содержат несколько рассредоточенных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. Например, мРНК с-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II обладают двумя или более перекрывающимися наномерами UUAUUUA(U/A) (U/A). МРНК GM-CSF и TNF-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III определены менее четко. Эти богатые U области не содержат мотив AUUUA, двумя хорошо изученными примерами этого класса являются мРНК с-Jun и миогенина.

[0211] Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мРНК, тогда как документально подтверждено, что элементы семейства ELAV, в первую очередь HuR, повышают стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Внедрение специфических сайтов связывания HuR в 3'-UTR молекул нуклеиновой кислоты приведет к связыванию HuR и, таким образом, к стабилизации мРНК *in vivo*.

[0212] В некоторых вариантах осуществления введение, удаление или модификация ARE 3'-UTR можно использовать для модулирования стабильности мРНК, кодирующей белок коннексин 26. В других вариантах осуществления ARE можно удалить или подвергнуть мутации для увеличения внутриклеточной стабильности и, таким образом, для увеличения трансляции и выработки белка коннексина 26.

[0213] В других вариантах осуществления последовательности неARE могут быть включены в 5'- или 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления последовательности интронов или частей интронов могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любых из конструкций, композиций, наборов и способов, представленных в настоящем документе. Включение интронных последовательностей может увеличить выработку белка, а также уровни мРНК.

Иллюстративная последовательность 5'-UTR (SEQ ID NO: 20)

GTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCG
GCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCC
AACGCCGAGACCCCCGCCCGGCCCGCGCGCTTCCTCCCGACGCAGAGCAAACC
GCCAGAGTAGAAG

Иллюстративная последовательность 5'-UTR (SEQ ID NO: 21)

TTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTC
AGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGA
ACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTTGGCCATGCACCTGG
GACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAG

Иллюстративная последовательность 5'-UTR (SEQ ID NO: 66)

GTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCG
GCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCC
AACGCCGAGACCCCCGCCCGGCCCGCGCGCTTCCTCCCGACGCAGTTTAGGACC
CTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATC
AGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTA
ACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGA

AGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAG

Иллюстративная последовательность 3'-UTR (SEQ ID NO: 22)

CGCATTGCCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGGATGAGGC
AACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTG
ACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCA
CAATGGAGCCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTC
TTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTG
GTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAG
GACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTC
CTGGGGTCTTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTT
GCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGT
TACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATG
TTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAAT
GGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACT
TTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAA
CATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATA
GCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGG
ATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCC
ATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAA
TTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGA
AGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAA
AGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTT
TAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAA
ATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATG
GTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTGTTGTC
AAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCT
TGTAACSTAAAATAATTTTGTAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAAAATATAATC
TCTATAATAA

Иллюстративная последовательность 3'-UTR (SEQ ID NO: 67)

GAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGC
TCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAA
CCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAA
GCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGT
TCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAA
ACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTT
CACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTCTTTTTTGCCAACTTTC
CCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAAC
AGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCT
TGTAAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCC
CTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTT

AATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTC
 TGTTGTATTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGA
 CAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATT
 TAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTA
 ATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGA
 AAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAAT
 GGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTT
 GGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAG
 TTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACAT
 GTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGAT
 TGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACAT
 ATTTCAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTT
 GTAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAACATAAAATAATTTTGTAAATGT
 ATCAAATACATTTAAAACATTAAAATATAATCTCTATAATAA

Иллюстративная последовательность 3'-UTR (SEQ ID NO: 68)

CGCATTGCCCAGTTGTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGC
 AACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTG
 ACCTTAAATGCAACCATTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCA
 CAATGGAGCCTCTGCTCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTC
 TTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTG
 GTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAG
 GACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTC
 CTGGGGTCTTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTT
 GCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGT
 TACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATG
 TTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAAT
 GGTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACT
 TTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAA
 CATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATA
 GCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGG
 ATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCC
 ATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAA
 TTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGA
 AGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAA
 AGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTT
 TAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAA
 ATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGAC

Иллюстративная последовательность 3'-UTR (SEQ ID NO: 69)

GAGCTCAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAACTCGAGCAGTGAATTCTACCAG
 TGCCATAGGATCCAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAAGGTACCCAGTGAATTCTACC

AGTGCCATAGTTAACCGCATTGCCCAGTTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAG
 AGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTAAC
 ACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAA
 CTCCAGATGCCACAATGGAGCCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAAT
 TCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGT
 TAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGT
 TTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGG
 TTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATT
 GGTTCTTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGC
 CTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTG
 ATGTAAAGATGTTCTGGATAACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGT
 AATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGG
 TTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATA
 GCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGA
 TGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGA
 AATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACAC
 ATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAG
 GTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGC
 AGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAA
 GTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCA
 GCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCT
 AAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCAT
 TATGCTTGAC

Последовательность-мишень миРНК-182 (SEQ ID NO: 78)

AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA

Последовательность-мишень миРНК-183 (SEQ ID NO: 79)

AGTGAATTCTACCAGTGCCATA

Последовательность-мишень миРНК-194 (SEQ ID NO: 107)

TCCACATGGAGTTGCTGTTACA

Последовательность-мишень миРНК-140 (SEQ ID NO: 108)

CCGTGGTTCTACCCTGTGGTA

Последовательность-мишень миРНК-18a (SEQ ID NO: 109)

CTATCTGCACTAGATGCACCTTA

Последовательность-мишень миРНК-99a (SEQ ID NO: 110)

CACAAGATCGGATCTACGGGTT

Последовательность-мишень миРНК-30b (SEQ ID NO: 111)

CTGAGTGTAGGATGTTTACA

Последовательность-мишень миРНК-15a (SEQ ID NO: 112)

CACAAACCATTATGTGCTGCTA

Участки внутренней посадки рибосомы (IRES)

[0214] В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая белок коннексин 26, может содержать участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES образует сложную вторичную структуру, которая обеспечивает инициацию трансляции из любого положения с мРНК, расположенной непосредственно после локализации IRES (см., например Pelletier и Sonenberg, *Mol. Cell. Biol.* 8(3):1103-1112, 1988).

[0215] Существует несколько последовательностей IRES, известных специалистам в данной области, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), риновируса человека (HRV), вируса паралича свержков, вируса иммунодефицита человека вирус (ВИЧ), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита С (HCV) и полиовирус (PV). См., например, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002; и Hellen et al., *Genes Dev.* 15(13):1593-612, 2001, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0216] В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES, которая включена в конструкцию, которая кодирует белок коннексин 26 или С-концевую часть белка коннексина 26, является последовательность 2А вируса ящура (FMDV). последовательность 2А вируса ящура представляет собой небольшой пептид (длиной приблизительно 18 аминокислот), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, MD et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Активность расщепления последовательности 2А была ранее продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и конструкции генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999; de Felipe et al., *Gene Therapy* 6:198-208, 1999; de Felipe et al., *Human Gene Therapy I* 1: 1921-1931, 2000; и Klump et al., *Gene Therapy* 8:811-817, 2001, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0217] IRES можно использовать в AAV конструкции. В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая С-концевую часть белка коннексина 26, может содержать участок внутренней посадки рибосомы (IRES) полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления IRES может быть частью композиции, содержащей более одной конструкции. В некоторых вариантах осуществления IRES используют для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена.

Сайты сплайсинга

[0218] В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, представленных в настоящем документе, может содержать последовательности донора сплайсинга и/или акцептора сплайсинга, которые функционируют во время процессинга РНК, происходящего во время транскрипции. В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга участвуют в транс-сплайсинге.

Иллюстративный интрон донора сплайсинга (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 23)

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCT
TGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT

Иллюстративный интрон акцептора сплайсинга (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 24)

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG

Последовательности Полиаденилирования

[0219] В некоторых вариантах осуществления конструкция, представленная в настоящем документе, может содержать сигнальную последовательность полиаденилирования (поли(А)). Большинство образующихся эукариотических мРНК обладают поли(А)-хвостом на своем 3'-конце, который добавляется в ходе сложного процесса, который включает расщепление первичного транскрипта и связанную реакцию полиаденилирования, управляемую сигнальной последовательностью поли(А) (см., например Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Поли(А)-хвост придает мРНК стабильность и переносимость (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(А) расположена на 3'-конце кодирующей последовательности.

[0220] В рамках настоящего изобретения «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта, с молекулой матричной РНК. В эукариотических организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) полиаденилированы на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000), добавленную к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост добавляют к транскриптам, которые содержат конкретную последовательность, например сигнал полиаденилирования (или поли(А)). Поли(А)-хвост и связанные белки помогают защищать мРНК от разложения экзонуклеазами. Полиаденилирование также участвует в терминеции транскрипции, экспорте мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование обычно происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, но также может происходить позже в цитоплазме. После завершения транскрипции цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA рядом с сайтом расщепления. После расщепления мРНК остатки аденозина добавляют к свободному 3'-концу на сайте расщепления.

[0221] В рамках настоящего изобретения «сигнальная последовательность поли(А)» или «сигнальная последовательность полиаденилирования» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

[0222] Имеется несколько сигнальных последовательностей поли(А), которые могут быть использованы, включая последовательности, полученные из гормона роста крупного

рогатого скота (bGH) (Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 81(13):3944-3948, 1984; патент США № 5122458, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), мышиногo β -глобина, мышиногo α -глобина (Orkin et al., EMBO J 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood 71(2):313-319, 1988, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), человеческого коллагена, вируса полиомы (Batt et al., Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790, 1995, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), гормона роста человека (hGH) (Szymanski et al., Mol. Therapy 15(7):1340-1347, 2007, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки), группы, содержащей сайт поли(A) SV4, например поздний и ранний сайт поли(A) SV40 (Schek et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0223] Сигнальная последовательность поли(A) может быть AATAAA. последовательность AATAAA может быть заменена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными AATAAA, которые способны передавать сигнал полиаденилирования, включая ATTAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAA или AATAAG (см., например WO 06/12414, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0224] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) может представлять собой синтетический сайт полиаденилирования (см., например конструкция экспрессии pCl-neo Promega, которая основана на Levitt et al., Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (AAATAAAATACGAAATG) (см., например WO 05/073384, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) содержит или состоит из сайта поли(A) SV4. В некоторых вариантах осуществления сигнал поли(A) содержит или состоит из SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) содержит или состоит из bGHpA. В некоторых вариантах осуществления сигнал поли(A) содержит или состоит из SEQ ID NO: 26. В данной области известны дополнительные примеры сигнальных последовательностей поли(A). В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с последовательностью поли(A), представленной в SEQ ID NO: 25.

Иллюстративная сигнальная последовательность поли(A) bGH (SEQ ID NO: 25)

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GG

Иллюстративная сигнальная последовательность поли(A SV40) (SEQ ID NO: 26)

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA
ATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCAT
CAATGTATCTTA

Дополнительные Последовательности

[0225] В некоторых вариантах осуществления конструкции согласно настоящему раскрытию могут содержать одну или несколько филлерных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления филлерные последовательности могут функционировать в качестве регуляторных элементов, изменяющих экспрессию конструкции. В некоторых таких вариантах осуществления филлерные последовательности можно не удалять полностью перед изготовлением для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления филлерные последовательности могут иметь функциональную роль, в том числе в качестве линкерных последовательностей, регуляторных областей или стабилизирующих областей. Как должно быть понятно специалистам в данной области, филлерные последовательности могут значительно различаться по первичной последовательности, сохраняя при этом нужную функцию. В некоторых вариантах осуществления конструкции может содержать любую комбинацию филлерных последовательностей. Иллюстративные филлерные последовательности, которые могут функционировать в качестве регуляторных последовательностей, представлены в SEQ ID NO: 27 или 28.

[0226] В некоторых вариантах осуществления конструкции согласно настоящему раскрытию могут содержать элемент или последовательность T2A. В некоторых вариантах осуществления конструкции согласно настоящему раскрытию могут содержать один или несколько сайтов клонирования. В некоторых таких вариантах осуществления сайты клонирования можно не удалять полностью перед изготовлением для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления сайты клонирования могут иметь функциональную роль, в том числе в качестве линкерных последовательностей, частей сайта Козака или в качестве сайтов, кодирующих терминирующий кодон. Как должно быть понятно специалистам в данной области, сайты клонирования могут значительно различаться по первичной последовательности, сохраняя при этом нужную функцию. В некоторых вариантах осуществления конструкции может содержать любую комбинацию сайтов клонирования. Иллюстративные сайты клонирования представлены в SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 92. В некоторых вариантах осуществления конструкции могут содержать дополнительные сайты клонирования длиной менее пяти нуклеотидов.

Иллюстративная Регуляторная последовательность С3 (SEQ ID NO: 27)

CTTCTTCTGGAGTCTTTTCTGGAATAATTCTGGGAGTGGGCTCAGCCTGCGGG
 AGAGTAACATTTTTATAACTTGATAGATGTAGCTGAGATGCCTCCCAGAGGGGAGA
 CCCGCCTCTCCTCCGGCAGCTGTGCACGTAGGCTTGTTCCCAGCAGCCTGGCCAGGG
 TGGTCCACCTGGTGTTTCTCATCTTCTTTCCCGGAGCGCTGACTCCTGCGCGTCCTC
 TTGGAAGACTCTTGACAGGACGGGTGTTTTATGGGTGTGATTCAGTGTCTCTTGCA
 TCAGTTCAATGTGGTGGTGTTCATCAACCCTTGAGCGTTAGCAAAATTTGCTCAA
 GTCATTCCGCAGGAATGTCTGTGTCTTGCTTCCAAGAAAGCTTGTAAGTGCCGGCAA
 CAGGCCAAGCAGCTCACAAACCTGACCACAAGCCTGTGAGTAATTGTGGGGCAGCA
 CTTAGCAGTCTTTTATTTTCGACTTATTAAGTCTCATCTTGGCCTCACCTTCTCCCTG
 GAAGGTGGCGTGGGTGGGAACCACTGGGTCAGATCTTTTTCACCCTTGCCGTGGAGC
 CAGTTTCCTGTTGCATGTGGGGGAAGCAACATGTGGTGAAGAGTATAGAAAACGAA
 AACATGTGGGTACAGTATGTATAAGTGGAGGGGAACAACTCATAATTCCAAC TAGT
 TTCTCATGAGAGACTCATGAATCATTGTGGTAGTTCTCAATATAAACTTAATCTAGG
 CCGGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCTCAGCACTCTGGGTGGATCACTTGAGGTC
 AGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACATGGAGAAACCCCATCGCTACTAAAAATAC
 AAAATTATCCAGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAG
 GCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGACCAACATGGAGAAA
 CTGTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGACGCATGCCTGTAATC
 CCAGCTATTTGGAGGCCGAAGCAGG

Иллюстративная Регуляторная последовательность D7 (SEQ ID NO: 28)

CTTCTTCTGGAGTCTTTTCTGGAATAATTCTGGGAGTGGGCTCAGCCTGCGGG
 AGAGTAACATTTTTATAACTTGATAGATGTAGCTGAGATGCCTCCCAGAGGGGAGA
 CCCGCCTCTCCTCCGGCAGCTGTGCACGTAGGCTTGTTCCCAGCAGCCTGGCCAGGG
 TGGTCCACCTGGTGTTTCTCATCTTCTTTCCCGGAGCGCTGACTCCTGCGCGTCCTC
 TTGGAAGACTCTTGACAGGACGGGTGTTTTATGGGTGTGATTCAGTGTCTCTTGCA
 TCAGTTCAATGTGGTGGTGTTCATCAACCCTTGAGCGTTAGCAAAATTTGCTCAA
 GTCATTCCGCAGGAATGTCTGTGTCTTGCTTCCAAGAAAGCTTGTAAGTGCCGGCAA
 CAGGCCAAGCAGCTCACAAACCTGACCACAAGCCTGTGAGTAATTGTGGGGCAGCA
 CTTAGCAGTCTTTTATTTTCGACTTATTAAGTCTCATCTTGGCCTCACCTTCTCCCTG
 GAAGGTGGCGTGGGTGGGAACCACTGGGTCAGATCTTTTTCACCCTTGCCGTGGAGC
 CAGTTTCCTGTTGCATGTGGGGGAAGCAACATGTGGTGAAGAGTATAGAAAACGAA
 AACATGTGGGTACAGTATGTATAAGTGGAGGGGAACAACTCATAATTCCAAC TAGT
 TTCTCATGAGAGACTCATGAATCATTGTGGTAGTTCTCAATATAAACTTAATCTAGG
 CCGGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCTCAGCACTCTGGGTGGATCACTTGAGGTC
 AGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACATGGAGAAACCCCATCGCTACTAAAAATAC
 AAAATTATCCAGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAG
 GCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGACCAACATGGAGAAA
 CTGTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGACGCATGCCTGTAATC
 CCAGCTATTTGGAGGCCGAAGCAGG

Иллюстративный сайт клонирования А (SEQ ID NO: 29)

TTGTCGACGCGGCCGCACGCGT

Иллюстративный сайт клонирования В (SEQ ID NO: 30)

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC

Иллюстративный сайт клонирования С (SEQ ID NO: 31)

TAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

Иллюстративный сайт клонирования D (SEQ ID NO: 32)

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGG

Иллюстративный сайт клонирования E (SEQ ID NO: 33)

TAAGAGCTC

Иллюстративный сайт клонирования F (SEQ ID NO: 34)

GCTGATCAGCCTCGA

Иллюстративный сайт клонирования G (SEQ ID NO: 35)GGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGA
CCGGTGGCCACC**Иллюстративный сайт клонирования H (SEQ ID NO: 36)**

AAGCTTGAATTC

Иллюстративный сайт клонирования I (SEQ ID NO: 37)

AGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGG

Иллюстративный сайт клонирования J (SEQ ID NO: 70)

GCGGCCGCACGCGT

Иллюстративный сайт клонирования K (SEQ ID NO: 71)

GCGGCCGCACGCGTGGT

Иллюстративный сайт клонирования L (SEQ ID NO: 72)

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGT

Иллюстративный сайт клонирования M (SEQ ID NO: 73)

CGCTAGCCACC

Иллюстративный сайт клонирования N (SEQ ID NO: 74)

ACCGGTCGCTAGCCACC

Иллюстративный сайт клонирования O (SEQ ID NO: 75)

GAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

Иллюстративный сайт клонирования P (SEQ ID NO: 76)

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT

Иллюстративный сайт клонирования Q (SEQ ID NO: 92)

CTCACCGGT

Иллюстративная линкерная последовательность (SEQ ID NO: 77)

GGATCCCGGGCT

Дестабилизирующие домены

[0227] В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, представленных в настоящем документе, может необязательно содержать

последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен («дестабилизирующую последовательность») для временного регулирования экспрессии белка. Неограничивающие примеры дестабилизирующих последовательностей включают последовательности, кодирующие последовательность FK506, последовательность дигидрофолатредуктазы (DHFR) или другие иллюстративные дестабилизирующие последовательности.

[0228] В отсутствие стабилизирующего лиганда белковую последовательность, функционально связанную с дестабилизирующей последовательностью, расщепляют путем убиквитинирования. В отличие от этого, в присутствии стабилизирующего лиганда расщепление белка ингибируется, обеспечивая таким образом активную экспрессию белковой последовательности, функционально связанной с дестабилизирующей последовательностью. В качестве положительного контроля стабилизации экспрессии белка, экспрессию белка можно обнаружить обычными способами, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы; анализы сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS); иммунологические анализы (например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимия).

[0229] В данной области известны дополнительные примеры дестабилизирующих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующей последовательностью является последовательность FK506 и связывающего рапамицин белка (FKBP12), а стабилизирующий лиганд представляет собой Shield-1 (Shld1) (Banaszynski et al. (2012) Cell 126(5): 995-1004, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующей последовательностью является последовательность DHFR, и стабилизирующий лиганд представляет собой триметоприм (TMP) (Iwamoto et al. (2010) Chem Biol 17:981-988, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0230] В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующей последовательностью является последовательность FKBP12, а наличие AAV конструкции, содержащей ген FKBP12, в клетке субъекта (например в поддерживающей кохлеарной наружной волосковой клетке) определяют с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующую последовательность можно использовать для подтверждения временно-специфической активности любой из AAV конструкций, описанных в настоящем документе.

[0231] В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен может представлять собой сайт-мишень для ингибирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен представляет собой неэндогенную последовательность, которая была введена в регуляторную область молекулы РНК. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен может обеспечивать временное и/или пространственное регулирование молекулы РНК. В некоторых вариантах

осуществления дестабилизирующий домен может быть мишенью эндогенно экспрессируемых ингибирующих молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующим доменом может быть регуляторный сайт и/или сайты-мишени миРНК (miRTS), как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен представлен в виде SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен представлен в виде SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий домен представлен в виде SEQ ID NO: 80.

Иллюстративная последовательность дестабилизирующего домена мРНК (SEQ ID NO: 78)

AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA

Иллюстративная последовательность дестабилизирующего домена мРНК (SEQ ID NO: 79)

AGTGAATTCTACCAGTGCCATA

Иллюстративная последовательность дестабилизирующего домена мРНК (SEQ ID NO: 80)

GAGCTCAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAACTCGAGCAGTGAATTCTACCAG
TGCCATAGGATCCAGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAAGGTACCCAGTGAATTCTACC
AGTGCCATAGTTAAC

Иллюстративная дестабилизирующая аминокислотная последовательность DHFR (SEQ ID NO: 38)

MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPA DLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPL
PGRKNILSSQPSTDDRVTWVKSVD EAIACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHI
DAEVEGDTHFPKPACИТЕЛЬPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

Иллюстративная дестабилизирующая нуклеотидная последовательность DHFR (SEQ ID NO: 39)

GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGG
AAAACGCCATGCCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCT
TAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCTGTCGTTGC
CAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACG
TGGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCAT
GGTGATTGGCGGCGGTCTGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGT
ATCTGACGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAG
CCGGATGACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCT
CACAGCTATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGATAA

Иллюстративный дестабилизирующий домен (SEQ ID NO: 40)

ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACG
CCATGCCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATA
AACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCTGTCGTTGCCAGGAC
GCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTG

AAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGAT
 TGGCGGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGTATCTGAC
 GCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGATG
 ACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCT
 ATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA

Иллюстративная аминокислотная последовательность дестабилизирующего пептида FKBP12 (SEQ ID NO: 41)

MGVEKQVIRPGNGPKPAPGQTVTVHCTGFGKDGDL SQKFWSTKDEGQKPF SFQI
 GKGA VIKGWDEGVIGMQIGEVARLRCS SDYAYGAGGFP AWGIQPN SVLD FEIEVLSVQ

Репортерные Последовательности или Элементы

[0232] В некоторых вариантах осуществления конструкции, представленные в настоящем документе, могут необязательно содержать последовательность, кодирующую репортерный полипептид и/или белок («репортерную последовательность»). Неограничивающие примеры репортерных последовательностей включают последовательности ДНК, кодирующие: бета-лактамазу, бета-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок, флуоресцентный белок mCherry, желтый флуоресцентный белок, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) и люциферазу. В данной области известны дополнительные примеры репортерных последовательностей. при связывании с регуляторными элементами, которые управляют их экспрессией, репортерная последовательность может подавать сигналы, обнаруживаемые обычными способами, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы; анализы сортировки клеток с активированной флуоресценцией; иммунологические анализы (например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

[0233] В некоторых вариантах осуществления репортерной последовательностью является ген LacZ, а наличие конструкции, содержащей ген LacZ в клетке млекопитающего (например в кохлеарной волосковой клетке), определяют с помощью анализов активности бета-галактозидазы. когда репортером является флуоресцентный белок (например зеленый флуоресцентный белок) или люцифераза, наличие конструкции, содержащей флуоресцентный белок или люциферазу в клетке млекопитающего (например в кохлеарной волосковой клетке), можно измерить флуоресцентными методами (например с помощью флуоресцентной микроскопии или FACS) или с помощью получения света в люминометре (например спектрофотометре или приборе визуализации IVIS). В некоторых вариантах осуществления репортерную последовательность можно использовать для подтверждения способности нацеливания на конкретные ткани и регуляторной и/или управляющей активности тканеспецифического промотора любой из конструкций, описанных в настоящем документе.

[0234] В некоторых вариантах осуществления репортерной последовательностью является метка FLAG (например метка 3xFLAG), а наличие конструкции, содержащей

метку FLAG, в клетке млекопитающего (например в клетке внутреннего уха, например кохлеарной волосковой или поддерживающей клетке) определяют с помощью анализов связывания или обнаружения белка (например Вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, радиоиммуноанализа (RIA), масс-спектрометрии). Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG представлена в SEQ ID NO: 42.

Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG (SEQ ID NO: 42)

GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACA
TCGACTACAAGGATGACGATGACAAG

Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG с терминирующим кодоном (SEQ ID NO: 81)

GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGG
ATGACGATGACAAGTAA

Иллюстративная метка штрихкода (SEQ ID NO: 93)

GTGTCACC

Иллюстративная метка штрихкода (SEQ ID NO: 96)

CACAACCT

Иллюстративная метка штрихкода (SEQ ID NO: 99)

CGTGTGTT

Иллюстративная метка штрихкода (SEQ ID NO: 102)

TCGTGGGT

Иллюстративная метка штрихкода (SEQ ID NO: 105)

GCAAACCTG

AAV Капсиды

[0235] В настоящем раскрытии представлена одна или несколько полинуклеотидных конструкций, упакованных в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV происходит или получен из капсида AAV серотипа AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, rh8, rh10, rh39, rh43 или Anc80 или одного или нескольких их гибридов. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV происходит из предкового серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой предковый (Anc) капсид AAV. Anc капсид получают из последовательности конструкции, которую конструируют с использованием эволюционных вероятностей и эволюционного моделирования для определения вероятной предковой последовательности. Таким образом, известно, что последовательность капсида/конструкции Anc не существует в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид Anc80 (например капсид Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления капсид AAV получают с использованием нуклеотидной кодирующей последовательности матрицы, содержащей SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, представленный в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98% по меньшей мере 99% или 100% с полипептидом, представленным в SEQ ID NO: 44.

[0236] Как показано в настоящем документе, любую комбинацию капсидов AAV и AAV конструкций (например содержащих ITR AAV) можно использовать в частицах рекомбинантного AAV (rAAV) согласно настоящему раскрытию. Например, варианты ITR AAV2 или ITR AAV2 дикого типа и капсид Anc80, варианты ITR AAV2 или ITR AAV2 дикого типа и капсид AAV6 и так далее. В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия частица AAV полностью состоит из компонентов AAV2 (например капсид и ITR относятся к серотипу AAV2). В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV2/6, AAV2/8 или AAV2/9 (например капсид AAV6, AAV8 или AAV9 с AAV конструкцией, имеющей ITR AAV2). В некоторых аспектах капсид AAV представляет собой капсид Anc80 (например капсид Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия частица AAV представляет собой частицу AAV2/Anc80, которая содержит капсид Anc80 (например содержащий полипептид SEQ ID NO: 44), которые заключает в белковую оболочку AAV конструкцию с ITR AAV2 (например SEQ ID NO: 8 и 9), фланкирующими часть кодирующей последовательности, например, ген GJB2 или его характеристическую часть (например SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В данной области известны другие частицы AAV, которые описаны, например, в Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления последовательность капсида имеет идентичность по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с нуклеотидной или аминокислотной последовательностью капсида, представленных в SEQ ID NO: 43 или 44, соответственно.

Иллюстративные последовательности ДНК Капсида Anc80 AAV (SEQ ID NO: 43)

```
ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGG
GCATTCGCGAGTGGTGGGACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAG
CAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACC
CTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCG
AGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGG
TATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG
GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGG
TCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAAT
CACCCCAGGAACCAGACTCCTCTTCGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCG
AAGAAGAGACTCAACTTTGGGCAGACAGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCTCA
ACCACTCGGAGAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCAG
CAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAA
CGCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACC
CCAGCACCCGAACCTGGGCCCCTCCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCT
CCAGCCAATCGGGAGCAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCC
```

TGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAG
 CGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTC
 AACATCCAGGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCACCACGACCATCGCCAATAA
 CCTTACCAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTCCT
 CGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGGCGGACGTCTTCATGATTCC
 TCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCTCCTT
 CTACTGCCTGGAGTACTTTTCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTT
 CAGCTACACGTTTGAGGACGTGCCTTTTCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCT
 GGACCGGCTGATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCA
 GACCACGAGTGGTACCGCAGGAAATCGGACGTTGCAATTTTCTCAGGCCGGGCCTA
 GTAGCATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGGCCCTGCTACCGGCAGCAA
 CGCGTCTCCAAGACAGCGAATCAAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGC
 CACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTCCCGCTATGGC
 AACCCACAAGGACGACGAAGACAAATTTTTTCCGATGAGCGGAGTCTTAATATTTG
 GGAAACAGGGAGCTGGAAATAGCAACGTGGACCTTGACAACGTTATGATAACCACT
 GAGGAAGAAATTAACACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCACGGTGG
 CCACTAACCTGCAATCGTCAAACACCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAA
 GGAGCCTTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCTATC
 TGGGCCAAGATTCCTCACACGGACGGACACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGC
 TTTGGACTGAAACACCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAGAATACACCTGTTCCCGCG
 AATCCTCCAACCTTACCTTACGTCCAGCTAAGTTTTCGCTCGTTCATCACGCAGTACAGC
 ACCGGACAGGTCAGCGTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAC
 GCTGGAACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACATAACAATCTACAAATGTGGAC
 TTTGCTGTTGACACAAATGGCGTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACC
 TCACCCGTAATCTG

**Иллюстративная Аминокислотная последовательность Капсиды Anc80 AAV
 (SEQ ID NO: 44)**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKY
 LGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAK
 KRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNAS
 GNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPWGYF
 DFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGTTTIANNLTSTVQ
 VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPS
 QMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRT
 LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMATHKDDKEDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITCM.EIKTTNPVATEQ
 YGTVATNLQSSNTAPATGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSP
 LMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEIQYTSNKNSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Композиции

[0237] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлены композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкцию, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или несколько конструкций, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество конструкций, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции, каждая конструкция отличается.

[0238] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит частицу AAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или несколько частиц AAV, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество частиц AAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной частицы AAV, каждая частица AAV отличается.

[0239] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит белок коннексин 26. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит клетки.

[0240] В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой или содержит фармацевтическую композицию.

Введение дозы и Объем введения

[0241] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, например один или множество AAV векторов, раскрытых в настоящем документе, вводят в виде одной дозы или в виде множества доз.

[0242] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в виде одной дозы. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в виде множества доз, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз.

[0243] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе (например композицию, содержащую одну или множество конструкций rAAV, раскрытых в настоящем документе), вводят в объеме примерно 0,01 мл, примерно 0,02 мл, примерно 0,03 мл, примерно 0,04 мл, примерно 0,05 мл, примерно 0,06 мл, примерно 0,07 мл, примерно 0,08 мл, примерно 0,09 мл, примерно 1,00 мл, примерно 1,10 мл, примерно 1,20 мл, примерно 1,30 мл, примерно 1,40 мл, примерно 1,50 мл, примерно 1,60 мл, примерно 1,70 мл, примерно 1,80 мл, примерно 1,90 мл или примерно 2,00 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в объеме примерно 0,01 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в объеме примерно 0,02 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в объеме примерно 0,03 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в объеме примерно 0,04 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в объеме примерно 0,05 мл. В

[illegible]

[0244] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе (например композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в настоящем документе), вводят в объеме примерно от 0,01 до 2,00 мл, примерно от 0,02 до 1,90 мл, примерно от 0,03 до 1,8 мл, примерно от 0,04 до 1,70 мл, примерно от 0,05 до 1,60 мл, примерно от 0,06 до 1,50 мл, примерно от 0,06 до 1,40 мл, примерно от 0,07 до 1,30 мл, примерно от 0,08 до 1,20 мл или примерно от 0,09 до 1,10 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе (например композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в настоящем документе), вводят в объеме примерно от 0,01 до 2,00 мл, примерно от 0,02 до 2,00 мл, примерно от 0,03 до 2,00 мл, примерно от 0,04 до 2,00 мл, примерно от 0,05 до 2,00 мл, примерно от 0,06 до 2,00 мл, примерно от 0,07 до 2,00 мл, примерно от 0,08 до 2,00 мл, примерно от 0,09 до 2,00 мл, примерно от 0,01 до 1,90 мл, примерно от 0,01 до 1,80 мл, примерно от 0,01 до 1,70 мл, примерно от 0,01 до 1,60 мл, примерно от 0,01 до 1,50 мл, примерно от 0,01 до 1,40 мл, примерно от 0,01 до 1,30 мл, примерно от 0,01 до 1,20 мл, примерно от 0,01 до 1,10 мл, примерно от 0,01 до 1,00 мл, примерно от 0,01 до 0,09 мл.

[0245] В некоторых вариантах осуществления схема введения дозы включает доставку в объеме по меньшей мере 0,01 мл, по меньшей мере 0,02 мл, по меньшей мере 0,03 мл, по меньшей мере 0,04 мл, по меньшей мере 0,05 мл, по меньшей мере 0,06 мл, по

меньшей мере 0,07 мл, по меньшей мере 0,08 мл, по меньшей мере 0,09 мл, по меньшей мере 0,10 мл, по меньшей мере 0,11 мл, по меньшей мере 0,12 мл, по меньшей мере 0,13 мл, по меньшей мере 0,14 мл, по меньшей мере 0,15 мл, по меньшей мере 0,16 мл, по меньшей мере 0,17 мл, по меньшей мере 0,18 мл, по меньшей мере 0,19 мл или по меньшей мере 0,20 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема введения дозы включает доставку в объеме самое большее 0,30 мл, самое большее 0,25 мл, самое большее 0,20 мл, самое большее 0,15 мл, самое большее 0,14 мл, самое большее 0,13 мл, самое большее 0,12 мл, самое большее 0,11 мл, самое большее 0,10 мл, самое большее 0,09 мл, самое большее 0,08 мл, самое большее 0,07 мл, самое большее 0,06 мл или самое большее 0,05 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема введения дозы включает доставку в объеме примерно 0,05 мл, примерно 0,06 мл, примерно 0,07 мл, примерно 0,08 мл, примерно 0,09 мл, примерно 0,10 мл, примерно 0,11 мл, примерно 0,12 мл, примерно 0,13 мл, примерно 0,14 мл или примерно 0,15 мл на улитку, depending на популяция.

Композиции с Одной AAV Конструкцией

[0246] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены композиции или системы, содержащие частицы AAV, состоящие из одной конструкции. В некоторых таких вариантах осуществления одна конструкция может доставлять полинуклеотид, который кодирует функциональную (например дикого типа или иным образом функциональную, например оптимизированную по кодонам) копию гена GJB2. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой или содержит конструкцию гAAV. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, одна гAAV конструкция способна экспрессировать полноразмерную матричную РНК GJB2 или ее характеристический белок в клетке-мишени (например в клетке внутреннего уха). В некоторых вариантах осуществления одна конструкция (например любая из конструкций, описанных в настоящем документе) может содержать последовательность, кодирующую функциональный белок коннексин 26 (например любую конструкцию, которая генерирует функциональный белок коннексин 26). В некоторых вариантах осуществления одна конструкция (например любая из конструкций, описанных в настоящем документе) может содержать последовательность, кодирующую функциональный белок коннексин 26 (например любую конструкцию, которая генерирует функциональный белок коннексин 26), и необязательно дополнительные полипептидные последовательности (например регуляторные последовательности и/или репортерные последовательности).

[0247] В некоторых вариантах осуществления композиция или система с одной конструкцией может содержать любую или все иллюстративные компоненты конструкции, описанные в настоящем документе. В некоторых аспектах конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная единственная конструкция представлена в виде

[illegible]

нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 106. Специалисту в данной области будет понятно, что конструкции можно подвергать дополнительным модификациям, включая оптимизацию по кодонам, введение новых, но функционально эквивалентных мутаций (например молчащих мутаций), добавление репортерных последовательностей и/или другую обычную модификацию.

[0249] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица гAAVanc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 45.

[0250] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 18, промотор CBA, приведенный, например, в SEQ ID NO: 11, химерный интрон, приведенный, например, в SEQ ID NO: 19, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 30, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 31, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 32 и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0251] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица гAAVanc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 46.

[0252] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 18, промотор CBA, приведенный, например, в SEQ ID NO: 11, химерный интрон, приведенный, например, в SEQ ID NO: 19, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 30, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно последовательность клонирования, приведенную, например, в SEQ ID NO: 33, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 22, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 34, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 32, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0253] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица гAAVanc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 47.

[0254] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, промоторную/энхансерную область, приведенную, например, в SEQ ID NO: 17, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 35, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 31,

филлерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 27, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 36, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 37, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0255] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 48.

[0256] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, промоторную/энхансерную область, приведенную, например, в SEQ ID NO: 17, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 35, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 31, филлерная последовательность, приведенный, например, в SEQ ID NO: 28, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 36, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 37, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0257] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 49.

[0258] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, промоторную/энхансерную область, приведенную, например, в SEQ ID NO: 17, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 35, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 31, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 32, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0259] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 50.

[0260] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 18, промотор CBA, приведенный, например, в SEQ ID NO: 10, химерный интрон, приведенный, например, в SEQ ID NO: 19, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 30, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 31, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 32, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0261] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80

содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 51.

[0262] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 8, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 29, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 18, промотор CBA, приведенный, например, в SEQ ID NO: 10, химерный интрон, приведенный, например, в SEQ ID NO: 19, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 30, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 33, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 22, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 34, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 32, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 9.

[0263] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 82.

[0264] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансер/промотор CAG, приведенный, например, в SEQ ID NO: 14, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 75, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0265] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 83.

[0266] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансер/промотор CMV/CBA, приведенный, например, в SEQ ID NO: 12, химерный интрон, приведенный, например, в SEQ ID NO: 64, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный,

например, в SEQ ID NO: 75, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0267] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 84.

[0268] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 63, промотор GJB2 человека, приведенный, например, в SEQ ID NO: 61, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 75, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0269] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 85.

[0270] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансер CMV, приведенный, например, в SEQ ID NO: 63, энхансер-промотор GFAP, приведенный, например, в SEQ ID NO: 62, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 75, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0271] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 86.

[0272] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 71, энхансер-промотор GFAP человека,

приведенный, например, в SEQ ID NO: 62, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 75, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0273] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 87.

[0274] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансер-промотор GFAP человека, приведенный, например, в SEQ ID NO: 62, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 66, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 73, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, дестабилизирующий домен, приведенный, например, в SEQ ID NO: 80, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 68, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 34, сайт поли(A), приведенный, например, в SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0275] В некоторых вариантах осуществления иллюстративная частица gAAVAnc80 содержит конструкцию, представленную в SEQ ID NO: 88.

[0276] В одном варианте осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 70, энхансерную область GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 65, промотор GJB2, приведенный, например, в SEQ ID NO: 61, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 72, последовательность 5'-UTR GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 20, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 74, область кодирования GJB2, приведенную, например, в SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, приведенную, например, в SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, приведенную, например, в SEQ ID NO: 67, необязательно сайт клонирования, приведенный, например, в SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, приведенный, например, в SEQ ID NO: 53.

[0277] В некоторых аспектах частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 94.

[0278] В одном аспекте конструкция содержит 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, последовательность промотора GDF6, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 90; минимальный промотор hGJB2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 92; необязательно синтетический штрихкод, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 93; последовательность 5'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 66, область кодирования GJB2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, поли(A), содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53.

[0279] В некоторых аспектах частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 97.

[0280] В одном аспекте конструкция содержит 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, промоторную последовательность IGFBP2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 95; минимальный промотор hGJB2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 92; необязательно синтетический штрихкод, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 96; последовательность 5'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 66, область кодирования GJB2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, поли(A), содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53.

[0281] В некоторых аспектах частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 100.

[0282] В одном аспекте конструкция содержит 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, промоторную последовательность RBP7, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 98; минимальный промотор hGJB2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 92; необязательно синтетический штрихкод, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 99; последовательность 5'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 66, область кодирования GJB2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, поли(A), содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53.

[0283] В некоторых аспектах частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 103.

[0284] В одном аспекте конструкция содержит 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, промоторную последовательность GJB6, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 101; минимальный промотор hGJB2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 92; необязательно синтетический штрихкод, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 102; последовательность 5'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 66, область кодирования GJB2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, поли(A), содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53.

[0285] В некоторых аспектах частица rAAVAnc80 содержит конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 106.

[0286] В одном аспекте конструкция содержит 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52, необязательно сайт

клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 71, промоторную последовательность PARM1, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 104; минимальный промотор hGJB2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 91, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 92; необязательно синтетический штрихкод, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 105; последовательность 5'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 66, область кодирования GJB2, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, линкерную последовательность, приведенную, например, в SEQ ID NO: 77, последовательность FLAG с терминирующим кодоном, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, 3'-UTR, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, поли(A), содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, необязательно сайт клонирования, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53.

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 45)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTTGTGACGCGGCCGACGC
 GTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
 ACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
 GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
 CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTAC
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCA
 CGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTT
 ATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC
 AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGC
 GGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGC
 GGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCT
 TCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACC
 GCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
 CGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGG
 CTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTG
 TGTGCGTGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCG
 GGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGG
 GCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGT
 GTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCC
 CCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCC

GTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG
 GGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC
 GGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCT
 TTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGA
 GCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGT
 GCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGC
 CGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGG
 GGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGC
 CTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTG
 GTTATTGTGACCGGTGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGG
 TGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTT
 TCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCG
 ACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAAGCTGTGCTACGATCACTACT
 TCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAG
 CGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTC
 ATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGA
 AGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGG
 TCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCAT
 GCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGT
 GTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAAT
 TTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGG
 AAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTT
 GCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCAC
 TCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG
 TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
 ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTG
 ACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC
 TGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGC
 TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 46)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTTGTGACGCGGGCCGCACGC
 GTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
 ACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
 GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
 CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTAC
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCA

CGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTT
 ATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC
 AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGC
 GGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGC
 GGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCCT
 TCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACC
 GCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
 CGCTTGTTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGG
 CTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTG
 TGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCG
 GGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCCGGG
 GCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGT
 GTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCC
 CCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCC
 GTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG
 GGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC
 GGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCCT
 TTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGA
 GCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGT
 GCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGC
 CGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGG
 GGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGC
 CTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTG
 GTTATTGTGACCGGTGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGG
 TGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTT
 TCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCG
 ACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACT
 TCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAG
 CGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTC
 ATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGA
 AGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGG
 TCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCAT
 GCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGT
 GTCCCGGCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAAT
 TTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGG
 AAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCCGCATTGCCCAGTTGTTAGATTAAGAAAT
 AGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTA
 GCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGG
 CCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAA
 CAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAG

ACCCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTCATATTTTAAACAGAGGAT
 ATCGGCATTTGTTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGG
 ACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTA
 AAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACA
 AAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTAT
 GATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCA
 GAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGA
 AATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTA
 TTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTA
 GAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGT
 AATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAG
 GCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACG
 CTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGG
 AAAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAGAAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGA
 CTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTG
 CTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAA
 GAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCT
 GAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTAG
 TGAGGGTAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATA
 TAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAAT
 ACATTTAAAACATTAAAATATAATCTCTATAATAAGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
 TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
 GGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG
 AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
 TTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAA
 TTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA
 CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAC
 GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
 GCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 47)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTTGTGACGCGGCCGCGACGC
 GTAAGCTTCGGTGAATTTAAAACGTTTGGTGGCAGTGGGTCAAGTAGCCAGGCGGC
 TGCCTAGAGTACCCCGAAGGGACATCGGCGACACCACAAACCTCGCGCTGGCGGC
 TCGCCCGCGCCTTTTTCCCTCCCGCGCGCGCCCGGCCCACTCGCACCCCGGGCGG
 TGCCATCGCGTCCACTTCCCCGGCCGCCCATTCAGCTCCGGAGCTCGGCCGCGAGA
 AACGCCCCGCTCCAGAAGGCGGCCCGCCCCCGGCCCAAGGACGTGTGTTGGTCC
 AGCCCCCGGTTCCCCGAGACCCACGCGGCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTCGCGGTC
 CCTCCCCGCGCCAGGTTCTGGCCGGGCAGTCCGGGGCCGGCGGGCTCACCTGCGTC

GGGAGGAAGCGCGGCGGGGCCGGGGCGGGGGTCTCGGCGTTGGGGTCTCTGCGCTG
 GGGCTCCTGCGCTCCTAGGCGGGTCTTGGGCCGGGCGCCGCCGAGGGGCTCCGAGT
 CGGGGAGAGGAGCGCGCGGGCGCTGCGGGGCGCAACACCTGTCTCCCGCCGTGGC
 GCCTTTTAACCGCACCCACACCCCGCCTCTTCCCTCGGAGACTGGGAAAGTTACGG
 AGGGGGCGGCGCCGCGGGCGGAGCGCGCCCGGCCTCTGGGTCTCAGAGCTTCCCG
 GGTCCGCGAACCCCCGACCGCCCCCGAAAGCCCCGAACCCCCCAAGTCCCCTTCGA
 GGTCCCGATCTCCTAGTTCCCTTTGAGCCCCCATGAGTTCCCCAAGTGCCCCCAGCGC
 CCTGAGTCTCCCCCGGTTACCCCGAGCGCCGCCTCCCCCAGCCCCTTGGCGGCCCCGG
 GTGAAGCGGGGGCGGCTGAGAGTCGGGACCCCCCAGGAAGCGGCGCCCCAGACCC
 CGGCTCCGGCGCTGTGCCGTGGGCGGGGTTCAAGGATGGCTGTGGTCGTTGTCCTCT
 GTACTCCGCATAGTGCGAGAGGACTTGGCATTATGAGCGCTTCTTTAATTTTTTATT
 GTTAGAGAAACAGGCATTCTCCAAGGACTGAAGATCTGTTTCGAGTCGCGGAGGCT
 GCGCGGGCCCGCGAGGCTCTCGCAGGGGGACCTAGGCTGGGTGGCGGGGCAGTGCC
 CTCTGGAATGGGGGTAAACGGTGGCCGAGGAGGGGGCGCCGCTGGTGCCGGCGAAG
 TCCCCGCTTCTTTCTCCCTCAAAATCTCACCAATCCGAACGAACGCCTTCTCGAATT
 TCCGATTTTATTCAATTACTTTCAACAATGTGCCAAGGACTAAGGTTGGGGGCGGTG
 GGAGAGACAAGCCTCGTTTTTGCCATGGCCGGCAGGGGGGTCCCGCCATCTGCGGA
 GGGTGCCCCCGCGGCCCCCGGCCAGCCAACTTCCTCCTCTTTTCGCAACTGGGGA
 ACTGCAAGGAGGTGACTCCTTTTCGGGGTGAGGAGGCCAGACTTTTCAGAAAGGAA
 AGAGGGCAGGTAAAACCTGCCAAGCCCCTTCCTGCTCGATGCACACAGCACGAAAG
 GGGGAAACTGATAGGATTCTGCGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
 ACCAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGACCGGTGGCCACCATGGATTGGGGCACGCTG
 CAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCT
 CACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGG
 GGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGT
 GTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGAT
 CTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGA
 GAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAG
 GAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAG
 CAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATG
 TACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAAC
 ACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATG
 ATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAA
 TTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
 GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
 ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
 CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
 GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
 AAGCTTGAATTCCTTCTTCTGGAGTCTTTTCTGGAATAATTCTGGGAGTGGGCTCAGC
 CTGCGGGAGAGTAACATTTTTATAACTTGATAGATGTAGCTGAGATGCCTCCCAGAG

GGGAGACCCGCCTCTCCTCCGGCAGCTGTGCACGTAGGCTTGTTCCCAGCAGCCTGG
 CCAGGGTGGTCCACCTGGTGTTCCTCATCTTCTTTCCCCGGAGCGCTGACTCCTGCGC
 GTCCTCTTGGAAGACTCTTGACAGGACGGGTGTTTTATGGGTGTGATTCAAGTGTCT
 CTTGCATCAGTTCAATGTGGTGGTGTTCATCAACCCTTGTAGCGTTAGCAAAATTT
 GCTCAAGTCATTCCGCAGGAATGTCTGTGTCTTGCTTCCAAGAAAGCTTGTAAGTGC
 CGGCAACAGGCCAAGCAGCTCACAAACCTGACCACAAGCCTGTGAGTAATTGTGGG
 GCAGCACTTAGCAGTCTTTTATTTTCGACTTATTAAAGTCTCATCTTGGCCTCACCTT
 CTCCCTGGAAGGTGGCGTGGGTGGGAACCACTGGGTCAGATCTTTTTTCACCCTTGCC
 GTGGAGCCAGTTTCCTGTTGCATGTGGGGGAAGCAACATGTGGTGAAGAGTATAGA
 AAACGAAAACATGTGGGTACAGTATGTATAAGTGGAGGGAACAACTCATAATTCC
 AACTAGTTTCTCATGAGAGACTCATGAATCATTGTGGTAGTTCTCAATATAAACTTA
 ATCTAGGCCGGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCTCAGCACTCTGGGTGGATCACT
 TGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACATGGAGAAACCCCATCGCTACTA
 AAAATACAAAATTATCCAGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA
 GGCTGAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGACCAACAT
 GGAGAACTGTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGACGCATGC
 CTGTAATCCCAGCTATTTGGAGGCCGAAGCAGGAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCT
 AGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
 CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA
 GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 48)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTTGTGACGCGGCCGCGACGC
 GTAAGCTTCGGTGAATTTAAAACGTTTGGTGGCAGTGGGTCAAGTAGCCAGGCGGC
 TCGCTAGAGTACCCCGAAGGGACATCGGCGACACCACAAACCTCGCGCTGGCGGC
 TCGCCCGCGCCTTTTTCCCCTCCCGCGCGCGCCCCGGCCCCACTCGCACCCCGGGCGG
 TGCCATCGCGTCCACTTCCCCGGCCGCCCCATTCCAGCTCCGGAGCTCGGCCGCGAGA
 AACGCCCCTCCAGAAGGCGGGCCCCCGCCCCCGGCCCAAGGACGTGTGTTGGTCC
 AGCCCCCGGTTCCCCGAGACCCACGCGGCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTCGCGGTC
 CCTCCCCGCGCCAGGTTCTTGCCGGGCGAGTCCGGGGCGGGCGGGCTCACCTGCGTC
 GGGAGGAAGCGCGGGCGGGGCCGGGGCGGGGGTCTCGGCGTTGGGGTCTCTGCGCTG
 GGGCTCCTGCGCTCCTAGGCGGGTCTTGCGGCCGGGCGCCGCCGAGGGGCTCCGAGT
 CGGGGAGAGGAGCGCGCGGGCGCTGCGGGGCGCAACACCTGTCTCCCGCCGTGGC
 GCCTTTTAACCGCACCCACACCCCGCCTCTTCCCTCGGAGACTGGGAAAGTTACGG
 AGGGGGCGGCGCCGCGGGCGGAGCGCGCCCGGCCTCTGGGTCTCAGAGCTTCCCG
 GGTCCGCGAACCCCGACCGCCCCCGAAAGCCCCGAACCCCCCAAGTCCCCTTCGA
 GGTCCCGATCTCCTAGTTCTTTGAGCCCCCATGAGTTCCCCAAGTGCCCCCAGCGC
 CCTGAGTCTCCCCCGGTTACCCCGAGCGCCGCCTCCCCAGCCCCCTTGCGCGGCCCGG
 GTGAAGCGGGGGCGGCTGAGAGTCGGGACCCCCCAGGAAGCGGCGCCCCAGACCC

CGGCTCCGGCGCTGTGCCGTGGGCGGGGTTTCAGGGATGGCTGTGGTCGTTGTCCTCT
GTA CTCCGCATAGTGCGAGAGGACTTGGCATTATGAGCGCTTCTTTAATTTTTTATT
GTTAGAGAAACAGGCATTCTCCAAGGACTGAAGATCTGTTTCGAGTCGCGGAGGCT
GCGCGGGCCCCGCGAGGCTCTCGCAGGGGGACCTAGGCTGGGTGGCGGGGCAGTGCC
CTCTGGAATGGGGGTAAACGGTGGCCGAGGAGGGGGCGCCGCTGGTGCCGGCGAAG
TCCCCGCTTCTTTCTCCCCTCAAAATCTCACCAATCCGAACGAACGCCTTCTCGAATT
TCCGATTTTATTCAATTACTTTCAACAATGTGCCAAGGACTAAGGTTGGGGGCGGTG
GGAGAGACAAGCCTCGTTTTTGCCATGGCCGGCAGGGGGTCCCGCCATCTGCGGA
GGGTGCCCCCGCGGCCCGGCCAGCCAACTTCCTCCTCTTTTCGCAACTGGGGA
ACTGCAAGGAGGTGACTCCTTTTCGGGGTGAGGAGGCCAGACTTTTCAGAAAGGAA
AGAGGGCAGGTAAAACCTGCCAAGCCCCTTCCTGCTCGATGCACACAGCACGAAAG
GGGGAAACTGATAGGATTCTGCGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
ACCAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGACCGGTGGCCACCATGGATTGGGGCACGCTG
CAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCT
CACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGG
GGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGT
GTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGAT
CTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGA
GAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAG
GAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAG
CAGCATCTTCTTCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATG
TACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAAC
ACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATG
ATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAA
TTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
AAGCTTGAATTCCCTGTAAAGCCAATTCCAACCCACTTGTAATTAAGAGAAAATCCC
ACGGTTCCTAATTGAAAGTCCTTTGTTCTATTTCTTGGGTATTTGTGTTTTTAGGCCTT
ATTTTTAGATGCATCATTAAGATTTTTTAAAGTCCTTTCAGGCATCAGGACTGATGA
TGCTGAATGATGGAGGGTTGTGGATAAGTTTTTTTTTTTTTTTAAACCAGGTAA
GGCTTTCCTGTTATCCTACTATGCTTAATTAAGAGCTGTATTTCTTAATATCATTGGT
GCCTGATTAGATTTAACTTTTAGATACAGTCTGTAAGATTTTTGAACCAGAAAAACC
TAAATAACTTATGACTGTTAGCAGTCATATTCTAGAAGAAGCAAATGTACTGAATTC
TTATGTACCTAGGATTTTAAGGGAGTACATACAAATCTTTCCTCAGTAGCAGGTACT
TTATTTTTATAACACACACATTTAAGCTGAGTTAAATATGCAGAACTGGTTGTACTTC
TTTGGCAGGAAAAGGGAAGCTTAGGATATCTTGTGACCAACTACCTCTTCCTTCTCA
AATAACTGGCAAATAACTTCAGGAAAATCCAGTTATGTTGTGTCATATTGCACCCCC

TAGGAAGTACTGGATTCTTAGTCTTGAGTGACTTTTAAATAAAGCTACCTTTTTCTCT
 TTCTTACATCGCAAGATCTTCAAATGTACCATTTCCCGCACAGAGAGTCCAAGGTAAA
 AGGACTGAAACCAAACCTTTGTTTTTGTAAAGTATTTTGGTCAGTGCAATGAGTTCAGA
 GACCAGGAGGTTAATGATTGTGAAGTCTTGTCAACAGCAACACCGTGTATGACCTGT
 GGTGCTTAGATGTTTCAAGAAACCCCAAGGTTAAAATGTCCCTGACCACATATCAGGCA
 AAAGGAATGTAAGGAAAACCAACTTAATCCTTTTGTCAAGAAGTATAAATGATGTA
 TCTTTCCAATCGGGTTGCATTGACTTTTGGGTCCAAATAGCTTGTGTCCACAGGCATC
 TTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA
 CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGAC
 GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
 GCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 49)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTTGTGACGCGGCCCGCACGC
 GTAAGCTTCGGTGAATTTAAAACGTTTGGTGGCAGTGGGTCAAGTAGCCAGGCGGC
 TCGCTAGAGTACCCCGAAGGGACATCGGCGACACCACAAACCTCGCGCTGGCGGC
 TCGCCCGCGCCTTTTTCCCTCCCGCGCGCGCCCGGCCCACTCGCACCCCGGGCGG
 TGCCATCGCGTCCACTTCCCCGGCCGCCCCATTCCAGCTCCGGAGCTCGGCCCGCAGA
 AACGCCCCGCTCCAGAAGGCGGCCCGGCCCGGCCCAAGGACGTGTGTTGGTCC
 AGCCCCCGGTTCCCCGAGACCCACGCGGCCGGGCAACCGCTCTGGGTCTCGCGGTC
 CCTCCCCGCGCCAGGTTCTTGCCGGGCAGTCCGGGGCCGGCGGGCTCACCTGCGTC
 GGGAGGAAGCGCGGGCGGGGCCGGGGCGGGGGTCTCGGCGTTGGGGTCTCTGCGCTG
 GGGCTCCTGCGCTCCTAGGCGGGTCTTGCGGCCGGGCGCCGCCGAGGGGCTCCGAGT
 CGGGGAGAGGAGCGCGCGGGCGCTGCGGGGCGCAACACCTGTCTCCCGCCGTGGC
 GCCTTTTAACCGCACCCACACCCCGCCTCTTCCCTCGGAGACTGGGAAAGTTACGG
 AGGGGGCGGCGCCGCGGGCGGAGCGCGCCCGGCCTCTGGGTCTCAGAGCTTCCCG
 GGTCCGCGAACCCCGACCGCCCCGAAAGCCCCGAACCCCAAGTCCCCTTCGA
 GGTCCCGATCTCCTAGTTCTTTGAGCCCCATGAGTTCCCCAAGTGCCCCAGCGC
 CCTGAGTCTCCCCCGGTTACCCCGAGCGCCGCTCCCCAGCCCCTTGGCGGCCCGG
 GTGAAGCGGGGGCGGCTGAGAGTCGGGACCCCCAGGAAGCGGCGCCCCAGACCC
 CGGCTCCGGCGCTGTGCCGTGGGCGGGGTTCAAGGATGGCTGTGGTCGTTGTCCTCT
 GTACTCCGCATAGTGCGAGAGGACTTGGCATTTATGAGCGCTTCTTTAATTTTTTATT
 GTTAGAGAAACAGGCATTCTCCAAGGACTGAAGATCTGTTCGAGTCGCGGAGGCT
 GCGCGGGGCCGCGAGGCTCTCGCAGGGGGACCTAGGCTGGGTGGCGGGGCAGTGCC
 CTCTGGAATGGGGGTAAACGGTGGCCGAGGAGGGGGCGCCGCTGGTGCCGGCGAAG
 TCCCCGCTTCTTTCTCCCTCAAAATCTCACCAATCCGAACGAACGCCTTCTCGAATT
 TCCGATTTTATTCAATTACTTTCAACAATGTGCCAAGGACTAAGGTTGGGGGCGGTG
 GGAGAGACAAGCCTCGTTTTTGCCATGGCCGGCAGGGGGGTCCCGCCATCTGCGGA
 GGGTGCCCCCGCGGCCCGGCCAGCCAACTTCCTCCTCTTTTCGCAACTGGGGA

ACTGCAAGGAGGTGACTCCTTTTCGGGGTGAGGAGGCCAGACTTTTCAGAAAGGAA
 AGAGGGCAGGTAAAACCTGCCAAGCCCCTTCCTGCTCGATGCACACAGCACGAAAG
 GGGGAACTGATAGGATTCTGCGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
 ACCAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGACCGGTGGCCACCATGGATTGGGGCACGCTG
 CAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCT
 CACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGG
 GGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGT
 GTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGAT
 CTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGA
 GAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAG
 GAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAG
 CAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATG
 TACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAAC
 ACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATG
 ATTGACAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAA
 TTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
 GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
 ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
 CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
 GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
 AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
 TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
 GAGGGAGTGGCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 50)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA
 GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTGACGCGGCCGCACGC
 GTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
 ACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
 GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
 CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGGTGAGCCCCA
 CGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
 ATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG
 GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGG
 CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGG
 CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC

GCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC
 GTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG
 CTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTC
 CGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT
 GCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGC
 GCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCG
 GTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGT
 GCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCCT
 GCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC
 GGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTG
 CCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGC
 GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA
 TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG
 AAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGTGCGG
 CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCGCGCCGCCGTC
 CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG
 GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT
 GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTA
 TTGTGACCGGTGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTG
 AACAAACACTCCACCAGCATTGGAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTCGC
 ATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTT
 TGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
 CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCT
 CCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCA
 AGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGT
 CCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCAT
 CTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTATGTACGACGGCTTCTCCATGCAG
 CGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCC
 CGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGC
 ATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGT
 CAAAAAAGCCAGTTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
 GCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
 ACTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
 TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA
 ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACG
 TGCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
 GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT
 GCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 51)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA

GCGCGGCGTCGCGGCGACCTTTGGTCGCGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTTGTGACGCGGCGCACGC
 GTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA
 TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
 ACCGCCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
 GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
 CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTAC
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCA
 CGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
 ATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG
 GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGG
 CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGG
 CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC
 GCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC
 GTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG
 CTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTC
 CGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT
 GCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGC
 GCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCG
 GTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGT
 GCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCT
 GCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGGCTCCGTGC
 GGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTG
 CCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGC
 GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA
 TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG
 AAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG
 CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTC
 CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG
 GACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT
 GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTA
 TTGTGACCGGTGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTG
 AACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGC
 ATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTT
 TGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCC
 CATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCT
 CCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCA
 AGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGT
 CCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCAT

CTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAG
 CGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCC
 CGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGC
 ATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGT
 CAAAAAAGCCAGTTTAAAGAGCTCCGCATTGCCAGTTGTTAGATTAAAGAAATAGAC
 AGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCAT
 TTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTC
 AGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAA
 AGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACC
 CCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATC
 GGCATTTGTTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACA
 CAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTAAA
 GGTGAACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTAACTCTAACAGTGGACAAA
 GTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGAT
 AGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAG
 GCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTGCTACTATGATTTAATTTGAAAT
 ATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCA
 TTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAA
 GTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAAT
 TTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCC
 TGTC AACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTG
 ATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACA
 AAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTG
 GACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTT
 ACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAA
 TAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAA
 TATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGA
 GGGTAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAATAATAA
 AGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAATTTTGTAATGTATCAAATACA
 TTTAAAACATTAAAATATAATCTCTATAATAAGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC
 TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT
 GCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT
 AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
 GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTC
 AGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
 CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
 CGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
 AA

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 82)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT

CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC
TAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC
CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGG
GGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCC
TTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG
CGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCC
CGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTT
CTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCT
GCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCG
GGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGCCC
GGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGC
GAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAA
CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCG
GCGGTGCGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCC
GGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCG
GGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGA
GGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCG
GCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCT
TTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGC
GGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCC
TTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCG
GGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTG
TGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACA
GCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCG
CGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGG
AGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCCGGCCCCGC
CGCGCTTCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCT
GAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGA
GGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCCG
TGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAG
CGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAA
CACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGATTATGA

TCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGC
AACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCC
CACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTG
GCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGG
AGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATC
GAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAA
GCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTG
GTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGGCC
ACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTG
CTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAA
AAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCA
TGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGG
ATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTAACACAAA
GATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCA
GATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATG
CCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGG
TTATTGGTGTAAAGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTC
TCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGG
TGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACCTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCT
TTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAA
ACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTA
AAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATAT
GTAAATGGTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATG
AATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAGCACC
TAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTT
ATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACA
GACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCC
TTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTT
GGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAG
GGAGAAGTTTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTG
ATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAA
TTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTA
GATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTG
ACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTG
TTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGAT
ATGCTTGTAATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAACATTAAATA
TAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
TGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTC
TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT

AGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTG
CCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC
GCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGG
GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 83)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC
TAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAAT
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC
CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGG
GGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCC
TTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG
CGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCC
CGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTT
CTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCT
GCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCC
TTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGTTGCGG
CCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGGCGCCCGGC
CCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGAC
CCCCGCCCCGGCCCCGCGCGCTTCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTTCGGA
AGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGAT
CCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTG
CTGAGAGCTGGGTTCCGTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAA
ACCGCCAGAGTAGAAGCGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCC
TGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCT
TCATTTTTTCGATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGC
AGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATC
ACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCAC
GCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGA
AGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACC
CAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTC
CGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCT
CCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTCAACACTGTGGACTGCT

TTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTG
 GAATTTGCATCCTGCTGAATGTCAGTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTT
 TGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTG
 ATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGAC
 AGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCAT
 TTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTC
 AGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAA
 GGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCC
 CAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCG
 GCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACAC
 AGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAG
 GTGAACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGT
 TACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATA
 GGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGG
 CTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATAT
 GGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCAAT
 GTGGTCATAGCACCTAACACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGT
 TCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTT
 TGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCT
 GTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGA
 TTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAA
 AATGGGGCAGGGGAGGGAGAGTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGG
 ACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTA
 CCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAAT
 AGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAAT
 ATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGAG
 GGTAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAA
 GAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACAT
 TTAACACATTAAATATAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTG
 CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG
 AAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC
 TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
 GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTG
 AATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
 CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
 CGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 84)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
 CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC
 TAGGGGTTCTGCGGCCGCGACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA

TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGGTAAGCTTCCGCAGAATCCTATCAGTTTCCCCCTTTTCGTGCTGTGTGCATC
GAGCAGGAAGGGGCTTGGCAGGTTTTACCTGCCCTCTTTCCTTTCTGAAAAGTCTGG
GCCTCCTCACCCCGAAAGGAGTCACCTCCTTGCAGTTCCCCAGTTGCGAAAAGAGGA
GGAAGTTGGCTGGGCCGGGGGCGCGGGGGGCACCCCTCCGCAGATGGCGGGACCCC
CCTGCCGGCCATGGCAAAAACGAGGCTTGTCTCTCCCACCGCCCCCAACCTTAGTCC
TTGGCACATTGTTGAAAGTAATTGAATAAAAATCGGAAATTCGAGAAGGCGTTCGTTC
GGATTGGTGAGATTTTGAGGGGAGAAAGAAGCGGGGACTTCGCCGGCACCAGCGGC
GCCCCCTCCTCGGCCACCGTTAACCCCCATTCCAGAGGGCACTGCCCCGCCACCCAG
CCTAGGTCCCCCTGCGAGAGCCTCGCGGGGCCGCGCAGCCTCCGCGACTCGAACAG
ATCTTCAGTCCTTGGAGGAATGCCTGTTTCTCTAACAATAAAAAATTAAAGAAGCGC
TCATAAATGCCAAGTCCTCTCGCACTATGCGGAGTACAGAGGACAACGACCACAGC
CATCCCTGAACCCCGCCACGGCACAGCGCCGGAGCCGGGGTCTGGGGCGCCGCTT
CCTGGGGGGTCCCGACTCTCAGCCGCCCCCGCTTACCCGGGCCGCCAAGGGGCTG
GGGGAGGCGGCGCTCGGGGTAACCGGGGGAGACTCAGGGCGCTGGGGGCACTTGG
GGAACATCATGGGGGCTCAAAGGAACTAGGAGATCGGGACCTCGAAGGGGACTTGG
GGGGTTCGGGGCTTTCGGGGGCGGTCGGGGGTTCGCGGACCCGGGAAGCTCTGAGG
ACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCGCGGCGCCGCCCCCTCCGTAACCTTCCCAGT
CTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGA
CAGGTCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGTTGCGGCCCCCGCAGCGCC
CGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCC
TAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCGGCC
CCGCCGCGCTTCTCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGC
GGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGG
AGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGT
TCCGTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTA
GAAGCGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAA
CAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATT
ATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGT
CTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCAT
CTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCT
AGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGG
GGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCG
CATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTT
CGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCG

GCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCG
 GCCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCAT
 CCTGCTGAATGTCCTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCA
 AAAAAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGA
 TCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAG
 GGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTCAACACA
 AAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTC
 CAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTA
 TGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGG
 GGTTATTGGTGTAAGGTACTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTT
 TCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTG
 GGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTT
 CTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTA
 AACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGT
 AAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAAT
 ATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGTTA
 TGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAGCA
 CCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGG
 CTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAAT
 ACAGACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCT
 CCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTGCG
 CTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGG
 GAGGGAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCT
 GTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCT
 CCAATTTTTTAAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGG
 TTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATG
 CTTGACATGGTTTTCAAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATTTT
 CCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAA
 TGATATGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAA
 AATATAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
 CAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC
 CCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC
 ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
 CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGA
 CGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC
 GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC
 CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 85)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
 CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC

TAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT
AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGACTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
ACCATGGGTGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTC
GGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCT
GCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCC
AGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTT
CCCGCCGCACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGG
CTTGCAATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCC
CCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTC
AGCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGC
AGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTG
AGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCCTCAGGCTATGCC
AGGGGGTGTGTCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCCTCCTTCATAAA
GCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATC
ACCTCCGCTGCTCGCCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGTTGCGGCC
CCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGCGCCCGGCC
AGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCC
CCGCCCCGGCCCCGCGCGCTTCTCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTGCGGAAG
AGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCC
TGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCT
GAGAGCTGGGTTCGTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAAC
CGCCAGAGTAGAAGCGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTG
GGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTC
ATTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAG
GCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCAC
TACTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGC
CAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAG
TTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCA
GAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCG
GGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCC
ATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTT
GTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGA
ATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTG
GGAAGTCAAAAAAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGAT
TATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAG

CATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATT
 CCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAG
 GTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGG
 CCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCA
 GGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGC
 ATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAG
 AGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTG
 AACATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTAC
 CAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGT
 TATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTC
 AGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCAATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGG
 TCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCAATTGT
 GGTCATAGCACCTAACAAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTC
 CTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTG
 TGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTC
 CAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTT
 AAAGAGGTCGCTTGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAA
 TGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGAC
 TCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACC
 CCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAG
 AAGCTAAGGTTTAGATAAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATAT
 TGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGAGGG
 TAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGA
 ATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTA
 AAACATTAATAATAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCT
 TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAG
 GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
 GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT
 TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAAT
 TCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
 CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCG
 GGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 86)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
 CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC
 TAGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTGGTGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGAC
 GCTGCTCTGACAGAGGCTCGGGGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGC
 AGACAGCCAGGCCTTGTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCC
 AGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGG
 GGTGGGCACAGTGCCTGCTTCCCGCCGCACCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAG

AAGCCCATTGAGCAGGGGGCTTGCAATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGG
GATAAAAGCAGCACAGCCCCCTAGGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGG
TGGAGAACAAGGCTCTATTCAGCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCA
GGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTC
CAAGGACACAAATGGGTGAGGGGAGCTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCCAACCC
CACCCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGGTGTTGCCAGGGGACCCGGGCATCGCCAGTC
TAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGG
TTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATT
GTGACCGGTGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCGACTCGGAGCCC
CTCGGCGGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGA
CCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCCGGCCCCGCGCGCTTCCTCCCGACGCAGTTTAG
GACCCTTGTTGCGGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTC
CATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCA
CCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGCTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTG
AGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGCGCTAGCCACCATGGATTGGGGCAC
GCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCT
GGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGT
GTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGA
ACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGGCCCTGCAGC
TGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGAC
ATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACAT
CGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACA
CAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGT
CATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCC
CAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTT
CATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTG
CTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTAC
AAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGA
CAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAG
GCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTGTA
AACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCTA
AAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTA
GTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTGGTGTAAAGGTACTTTTCATATTTT
AAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGG
TTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACT
TTCCCCACGTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCT
AACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAA
CTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATAACCATTATATGTTT
CCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTGCTACTATG
ATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGC

TGCTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGT
 GAGACAGACTAGAAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAA
 ATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTACTAC
 CTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCA
 TCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCAT
 TTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTTCGTTAAAAACA
 GATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTC
 AAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAAT
 AACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGG
 AAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTC
 CACATATTTAGTGAGGGTAAGTATTTTCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGC
 ATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAATTTTGT
 AATGTATCAAATACATTTAAAACATTTAAAATATAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTG
 ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTG
 CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAA
 ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG
 GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGG
 GCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTG
 ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA
 AAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
 CAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 87)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
 CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC
 TAGGGGTTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
 TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT
 ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT
 AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
 GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
 TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA
 CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT
 ACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC
 CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGACGCGATGGGGGCGG
 GGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGG
 GCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCC
 TTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG
 CGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCC
 CGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTT
 CTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCT
 GCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCG

GGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGGCCCGCGCTGCCC
GGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGC
GAGGGGAGCGCGGCCGGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAA
CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCG
GCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCC
GGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGGCTCGCCGTGCCGGGGCG
GGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGGCCGCTCGGGCCGGGGA
GGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCG
GCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCT
TTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGC
GGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCC
TTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCG
GGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTG
TGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTCTACA
GCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCG
CGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGG
AGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCGGGCCCCGC
CGCGCTTCCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTGCGGAAGAGGTGGTGTGCGGCT
GAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGA
GGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGG
TGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAG
CGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAA
CACTCCACCAGCATTGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGA
TCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGC
AACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCC
CACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTG
GCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGG
AGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATC
GAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTTCATCTTCGAA
GCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTG
GTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGGCC
ACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTG
CTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAA
AAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCA
TGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAGCTCAGTGTGAGTTCTACCA
TTGCCAAACTCGAGCAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGGATCCAGTGTGAGTTCTAC
CATTGCCAAAGGTACCCAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGTTAACCGCATTGCCAG
TTGTTAGATTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTG
TCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCA
TTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCCTCTGCT

CCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTT
 AAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTATTGGTGTAAGGTACTTTCA
 TATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAG
 CCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGC
 CAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTAA
 TCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGT
 GAAAACTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATAACCATTAT
 ATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTA
 CTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAG
 AGGCTGTCTGTTGTATTCAATTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATC
 GAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATG
 TCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTA
 CTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCC
 AGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGT
 ACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTTAA
 AAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCT
 ACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAG
 CTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCT
 ATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACGCTGATCAGCCTCGACTG
 TGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT
 GGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG
 TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
 AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCT
 TGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
 TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACG
 CCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 88)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT
 CGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC
 TAGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTCTTCTTCTGGAGTCTTTTCTGGAATAATTCTGG
 GAGTGGGCTCAGCCTGCGGGAGAGTAACATTTTTATAACTTGATAGATGTAGCTGAG
 ATGCCTCCCAGAGGGGAGACCCGCCTCTCCTCCGGCAGCTGTGCACGTAGGCTTGTT
 CCCAGCAGCCTGGCCAGGGTGGTCCACCTGGTGTCTTCTCATCTTCTTTCCCCGGAGC
 GCTGACTCCTGCGCGTCCTCTTGGAAGACTCTTGACAGGACGGGTGTTTTATGGGTG
 TGATTCAGTGTCTCTTGTCATCAGTTCAATGTGGTGGTGTTCATCAACCCTTGTAGC
 GTTAGCAAAATTTGCTCAAGTCATTCCGCAGGAATGTCTGTGTCTTGCTTCCAAGAA
 AGCTTGTAAGTGCCGGCAACAGGCCAAGCAGCTCACAAACCTGACCACAAGCCTGT
 GAGTAATTGTGGGGCAGCACTTAGCAGTCTTTTATTTTCGACTTATTAAAGTCTCATC
 TTGGCCTCACCTTCTCCCTGGAAGGTGGCGTGGGTGGGAACCACTGGGTGAGATCTT
 TTTACCCCTTGCCGTGGAGCCAGTTTCCTGTTGCATGTGGGGGAAGCAACATGTGGT

GAAGAGTATAGAAAACGAAAACATGTGGGTACAGTATGTATAAGTGGAGGGAACA
AACTCATAATTCCAAGTAGTTTCTCATGAGAGACTCATGAATCATTGTGGTAGTTCT
CAATATAAACTTAATCTAGGCCGGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCTCAGCACTC
TGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACATGGAGAAAC
CCCATCGCTACTAAAAATACAAAATTATCCAGATGTGGTGGCTCACACCTGTAATCC
CAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCA
GCCTGACCAACATGGAGAACTGTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCG
TGGTGACGCATGCCTGTAATCCCAGCTATTTGGAGGCCGAAGCAGGAAGCTTCCGC
AGAATCCTATCAGTTTCCCCCTTTCGTGCTGTGTGCATCGAGCAGGAAGGGGCTTGG
CAGGTTTTACCTGCCCTCTTTCCTTTCTGAAAAGTCTGGGCCTCCTCACCCCGAAAGG
AGTCACCTCCTTGCACTTCCCCAGTTGCGAAAAGAGGAGGAAGTTGGCTGGGCGG
GGGCCGCGGGGGGCACCCTCCGCAGATGGCGGGACCCCCCTGCCGGCCATGGCAAA
AACGAGGCTTGTCTCTCCACCGCCCCCAACCTTAGTCCTTGGCACATTGTTGAAAG
TAATTGAATAAAATCGGAAATTCGAGAAGGCGTTCGTTCCGATTGGTGAGATTTGA
GGGGAGAAAGAAGCGGGGACTTCGCCGGCACACAGCGGCGCCCCCTCCTCGGCCACC
GTTAACCCCCATTCCAGAGGGCACTGCCCCGCCACCCAGCCTAGGTCCCCCTGCGAG
AGCCTCGCGGGCCCGCGCAGCCTCCGCGACTCGAACAGATCTTCAGTCCTTGGAGG
AATGCCTGTTTCTCTAACAATAAAAAATTAAAGAAGCGCTCATAAATGCCAAGTCCT
CTCGCACTATGCGGAGTACAGAGGACAACGACCACAGCCATCCCTGAACCCCGCCC
ACGGCACAGCGCCGGAGCCGGGGTCTGGGGCGCCGCTTCTGGGGGGTCCCGACTC
TCAGCCGCCCCCGCTTACCCGGGGCCGCCAAGGGGCTGGGGGAGGCGGCGCTCGGG
GTAACCGGGGGAGACTCAGGGCGCTGGGGGCACTTGGGGAACTCATGGGGGCTCAA
AGGAACTAGGAGATCGGGACCTCGAAGGGGACTTGGGGGGTTTCGGGGCTTTTCGGGG
GCGGTTCGGGGGTTCGCGGACCCGGGAAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCT
CCGCCCGCGGCGCCGCCCCCTCCGTAACCTTCCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGG
GTGTGGGGTGCGGTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACAGGTGTTGCGGCCCCGCGAG
CGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCAGGACC
CGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCGCCCC
GGCCCCGCGCGCTTCTCTCCGACGCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGACCGGT
CGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAA
CACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGA
TCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGC
AACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCC
CACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTG
GCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGG
AGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATC
GAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCTCTTCGAA
GCCGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTG
GTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCC
ACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTG

CTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAA
AAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCA
TGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGG
ATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTCAACACAAA
GATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCA
GATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATG
CCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGG
TTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTC
TCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGG
TGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCT
TTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAA
ACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTA
AAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATAT
GTAAATGGTATGTCATTTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATG
AATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTTCATAGCACC
TAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTT
ATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACA
GACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCC
TTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTT
GGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAG
GGAGAAGTTTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTG
ATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAA
TTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTA
GATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTG
ACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTG
TTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAATAATAAAGAATAGCTTTAATGAT
ATGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAAAATA
TAATCTCTATAATAAAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCC
CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
AGCGCGCAG

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 94)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGGTCCACAGGTAACCTCCGTGCG
GCGTCCACAGGGGGGCGAGGAGATACCATACTGCACAGTTGTACGTCTTCCATCTGTT
TGGTGTAGAAAAATCTAACCCTACAAGAATGCCACGGGCACTGTGGCAGACAGAA
GCAGCGCTACGCCGCATCGCCTTTCAGCGTGCAGGCCAGGAATGAGCGAGGCAGT
GGGCGGGGAAGACAGGCACGGGGAATCTGGGGACAGATAAAGGAACTCGTGATG
GGGCGAGGCTGGGCTGAAGAGAAACAGATTGGGGTAGAGCTGCAAAGGGAGGGGT

CCACTGGAAGGCGAGGGGGGAGGCCGGGAAGAGAGAGGGTGGGAAGGCAGTGTGA
GATGGGAGGGCAGTGTGAGAAGAAAAGCAGGCTGGGGAAGAGGGATTGGAATGCA
GAAGGAAC TTGGGGAAGGAGGAAGTCCTGCAGGCGGGAGGGAAAGAAGAGAGGG
GGAGCAGCTAAAGTCTGCGTCAGAAGAGGTTGGGGACTGCGAGAGGAGAGGCTGG
GGCCTGCAGGGGAGCGCAGCAGCTTTTAGCATCGATCCAACTCTAAAGACTCGTG
GCCTTTGCCTGACCTCGAGGGTCGGGAATAGACGCCTGTCTTTGTGGAGAGCGATAC
CCAACCGAGAAAATGGGGCTGTTCCGAGCTGGGCCCTGCGCCTGGCCCAGGGCGAG
GCTTCTCTGGCTCCGGGCTGGCCCCTGAGGGGCAGCACGCAGCCTGCAGCAGAGGC
GCCTGCTCCAAGCTGTCTCTTGGGGGCGCCGCCGCCGCTTCCCTCCTCCGGGGCCGC
TCGCTCCCAGGAAAGTGGAGGCGGCTGGCGAGGACCGAGAGCCGGGGCCGCGCTGC
GGAGGGACCACACCTCCGGGAGTTCGAGGGGGACCCTGGCGCGGCGGGGCCAGCCTT
TCGGGCGCGCAGCGCCCCGCTTCCCCCGGTGAGCGCTTGCGGCCCGCGCCGCGCGCA
CCGCCCGGCAACCCCGCGCGCGTCCCGCGGGGGCGCTGCGTCTTCCTGCCACACCGG
CGCACCGCGGGCCCCTCTCCCCACACCTCCGGCCCCGCACCACCGGCTCTCCTCCCA
CCCTCCCCACCCCTCCTCTGCCCTCCCTCCCCATTCTCCTCCCTCCCGGCGAGGGGCGG
GAGGGGGCGTGGCGGGGGCCGGGGTTTGTGTGGCTGGGACCCGGCTCCTCAAGCTCT
GAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCGCGGCGCCGCCCCCTCCGTAAC TTTC
CCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCACGGCG
GGAGACAGGTCTCACCGGTGTGTACCGTTGCGGCCCGCGAGCGCCCGCGCGCTCCT
CTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCA
GGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCGCCCCGGCCCCGCGCGCT
TCCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTGCGGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACC
CGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAG
GCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTGGCC
ATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGCGCTA
GCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTC
CACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATCCTC
GTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACAC
CCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACAT
CCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCAT
GCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATA
AAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAG
GCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTATCTTCGAAGCCG
CCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGA
AGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACGG
AGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGA
ATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGC
CAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGAC
ATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGA
GGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATT

CTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATG
CCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTG
TCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTAT
TGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTG
AGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTC
CTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCA
TTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCT
GTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGA
TGTTCTGGATAACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAA
ATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATA
CTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTATTGTGGTCATAGCACCTAAC
AACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGA
TAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACT
GGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTT
CCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGG
AATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGA
GAAGTTTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATT
AAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTT
TTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGAT
AAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACA
TGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATTTTCTGTTGT
CAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGC
TTGTAACATAAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAAAATATAAT
CTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTC
CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
CTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCG
GACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG
CTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCT
CCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCG
CCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCC
ACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAAGTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGT
AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTC
TTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTAT
TCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA
TTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTTATGGT

GCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGC
 CAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGAC
 AAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGA
 AACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGA
 ACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATT
 CAACGGGAAACGTGCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGG
 GTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTA
 TGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCA
 ATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTC
 CGACCATCAAGCATTTTATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGA
 TCCCCGGAAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAAT
 ATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATT
 GTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATA
 ACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAAC
 AAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC GGATT CAGTCGTCACTC
 ATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTA
 TTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGA
 ACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTAT
 TGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA
 TCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
 AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG
 CAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACC
 AACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCCT
 TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
 CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
 ACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
 GGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT
 ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
 AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
 GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
 GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

Таблица 3: Компоненты последовательности конструкции (SEQ ID NO: 94)

Компоненты	Положение в конструкции
5' ITR	12-130
Сайт клонирования	131-147
Промотор GDF6	148-1335
Минимальный промотор hGJB2	1336-1463
Сайт клонирования	1464-1472

Синтетический штрихкод	1473-1480
5'UTR	1481-1842
GJB2 (экзон2)	1854-2531
3xFLAG	2544-2609
3'UTR (экзон2)	2613-4019
bGHPA	4041-4265
Сайт клонирования	4266-4299
3'ITR	4300-4429

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 97)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGG
 CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
 AACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGCCGCACGCGTGGTAAGAACTTGCCCGAGTT
 TACACAGCTAGTAAATGGTTGCATTAGTCAGGACAGCTAGCCTATATTACAATAACA
 ACCCTCTCAAATCCTAATGGCTTAAAACAACAGAGGTTTAATTTATACTCATTAGCT
 GTTCAAGGCAGGAGGCTCTATTCTCTAATCCATACAGTCACTCAGGATCCAGGCTGG
 TGGAGACCCTGCCATATTGTAGCCTCACCATTAAAACATGAAGAAGATAGAAAGT
 GAGGAGTCATGTAGGTTTTGTTCGGTTGCCTCAGGCTAGGAGTGACAGGTCACTTCA
 TCTCACTCACAGCTCACTGCCCACAACCTAGTCACTTGTGACTGTGCGAGTTAAGCTT
 CTGTGTGTGAAGGAAGGAAAAGAGAATGGGATAAAGGTGAACATCAGCAGGCTCT
 ACCACAGTAGTTTGAACCAAGACTTGAGCCTAGGTCATGTGGCTTCAGAATCTTTGC
 TCTTAATCACACTAAACAGCCTCTGTAAAGTCATCTTTCCTTCATCCAGTGCCTAAGAA
 CATGCAGTCCAATGCCCTCATCCTTCAGAAGAAGCTTGAGTGAAGTCAAGAGAAATTGA
 GTAGAGTGCCACAGCATGCCCAAGGCCACACACCCTGAGGTTGGCAGTAGGTCCTG
 AGTTAGAGTTGTCATTTCTTGGCTCCCCTGGTAGTAGTGGAAGGTAAGGTTTTGAC
 ATAAGTAGTTGGATGACCACGGGCAGGTCCTTAAATTGTCTAAGCATCGTTTGACCC
 TTGTAAGAATTAAATGAAATAGCACCTGTAAAAGTGTCTGCACGGACTTACTGCTGT
 TAGTTTTGTTTCTTTCTTCTGTTGTCAGTCACTTCCCTGCCTGTTACCCAGGCCATG
 CAGACCAGCCAGGCCTTCGACTTACAGTGCGGATAAGATTCCAAATCTCCACGGCTG
 GTTTCATGCTTTCTTCCAGGCTTCTGAGGACCCTGTGCTCTGGTTTCTTCTATTTCTT
 TTCTATTACTTTTCTGTTACTCTTGAGCACACTTGCTGGAAGCAATATGCATCCAGTT
 CTCCCTCTCTTGCCTCATTACACTTTGCAGAACAACTCCAATCCCTTCCAACCAAGTA
 GTCCCTTTGAATTTCTTGTACCCAAGGAATCTCTCTGACAGGGGTCTTTGTTAGGGT
 CACACCCCAGGAGATGGTTGATTATGGCTGAGTCCAGCCTGGAATGATGGGGGTG
 GGGGCAGCTTGGGTAGATGACTCAGTAAATCAAACAGAACAATGAAAGGAGGTCAT
 GCTTGTCCATCTGCATTATTGAAGACAGCCATAAATGGCCTTACCCAGAGCGGGTC
 TGTCACACCTGGAGAGCTGATCTGACCTCTCCAAGACCCCTGCAACTGAGTGTTCTG
 GGATCTGTCTTGCAACAAGTGCCTCGAGATTTGTAGGTGGGGGCCAGAGGGAGGG
 GGTCTGCAGACGAAGGGGGCAGGTTTTGCGGGGCACTTAGGGTTCTCATAGGTTGT
 AGTCACGAGCTCCAAGCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCGCGGCG

CCGCCCCCTCCGTAAC TTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCG
GTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACAGGTCTCACCGGTCACAACTGTTGCGGCCC
CGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCCTCGGCGGGCGCCCGGCCA
GGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCC
GCCCCGGCCCCGCGCGCTTCTCCCCGACGCAGTTT TAGGACCCTTGTTGCGGAAGAG
GTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTG
CCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGA
GAGCTGGGTTCGCTGGCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCG
CCCAGAGTAGAAGCGCTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGG
GGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCAT
TTTTCGCATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGC
CGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTA
CTTCCCCATCTCCACATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCA
GCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTT
CATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAG
AAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGG
GTCATCTTCGAAGCCGCTTCATGTACGTCTTCTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCA
TGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTAACACTGTGGACTGCTTTG
TGTCCCGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAA
TTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGG
GAAGTCAAAAAGCCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATT
ATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGC
ATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTC
CCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGG
TGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGC
CTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCAG
GCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCA
TTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGA
GAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGA
ACATTGGTTCTTTCAATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACC
AGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTT
ATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCA
GATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTC
TTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCAATTGTGG
TCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTA
GTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGT
AAGAAATACAGACTGGATGTACCACCACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCA
ACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAA
AGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATG
GGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCTGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTC

TAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCC
TTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAA
GCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGC
CATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAA
GTATTTTCCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAATAATAAGAATA
GCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAAATTTTGTAATGTATCAAATACATTTAAA
ACATTAATAATAATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC
TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT
GCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT
AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTC
AGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGG
CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCC
TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAG
CAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTAC
GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTC
CCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGG
GTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACC
CTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTT
AAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTTAACGCGAATTTTAACAATAATTAACGTT
TACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA
GCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGTCTCCCGGC
ATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTC
ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
GGTTAATGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGT
GTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGA
TGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGAC
AATCTATCGCTTGATGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAA
AGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGG
AATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTT
ACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
ATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTTCTGCGCCGGTTGCATTCTGA
TTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCA
ATCACGAATGAATAACGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGG
CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGA
TTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAA
TTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTT

GCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTC
 AAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCG
 ATGAGTTTTTCTAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAG
 CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCG
 TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGG
 ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC
 CAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
 CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
 ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG
 CGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
 CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
 GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAC
 GAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
 CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAA
 AAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCAC
 ATGT

Таблица 4: Компоненты последовательности конструкции (SEQ ID NO: 97)

Компоненты	Положение в конструкции
5'ITR	12-130
Сайт клонирования	131-147
Промотор IGFBP2	148-1660
Минимальный промотор hGJB2	1661-1788
Сайт клонирования	1789-1797
Синтетический штрихкод	1798-1805
5'UTR	1806-2167
GJB2 (экзон2)	2179-2856
3xFLAG	2869-2934
3'UTR (экзон2)	2938-4344
bGHpA	4366-4590
Сайт клонирования	4591-4624
3'ITR	4625-4754

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 100)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGG
 CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
 AACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCACGCGTGGTCCCATGGCTCTGTAAAA
 TCAAAGAAACATCTTTTCCAACAGCCCTTTCAAACCTCCTCATCGCATCTCACTGGCT
 GATTCAGTCATTTAAACCTGCTTCTCCCTAAAGCTGATCACTGGCTAAGCTAATAGG

GTTTCCGGGATTGGTTTAGCCTGATACTAATCCAGGTCTACCTTCAGGAGCCAGACC
AAACTGCCTATTGGCATTGCATTCTTGCAGTAGGGAGGGGAGGTATGGATGGTGTG
GAGTCCACCACAAGGTCCATGCCAGTCTTTGCTGAACCAGCATCAGACTCCATCAAG
CAACAGATGAGAGGTTCCATGATAAAGTGGCCCTCAGCAATCCCCATCCATTGCTGT
CTAGGAAGAACAGTGCTTGTACACAGGTTTAGGACCTCAGTCTTGGCTGTAATCTTC
TGGTTTACTTTGCCAGCACCAAACAGAAGGAAAGAAAGGGCTCAAATTTGACCAAA
TAAATTATGCTTCTCCTTCCAGAGATAACCTTGAGTCCTGTCTAGGAAGATATTAGA
ATTGTAAAGAAAAAAAAAATTACTCCTTATCCTATGGCAAGTGGAGTCTATGTCTAC
TTCAGCTGAAATTAATCCTGTCCATAATAGATGACCCTTGCTCAAGCTGGCCAGAA
GCCATACCAACCAGCACGAAGGTTAAACTATTATTAGTTTTTTTCTGTGATTTTCATT
TTCAGGCCAAGTTTTAGAACAAATAAGATTTTAAGAATAGGAAGTAAGTAAGATTTCT
GCATATCCTGTTCTCTTAGTCAGCTGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCCTAACTCA
GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCAAGCCTGGAATCTA
TGTCTTACAGTTATGAGAATCAACAGCTAGCTCATTATGGGCAAGGTGATGTCACTC
TGGCTTCTCAATGAAAATGGCATTCTCCTTGGAAGGTCATAGCCAGTCAGTCA
GTCAGTCACGGGAGCGCAGCGGCTTCTAGGGGTGAGTGGGACCCACGCGGCCCCAC
CTGCTCCTCCCGCGCGCGGCCCCACCCCCCTGCCCCGCCCGCCTGGTTTATAGAAG
CTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCCGCGGCGCGCCCCCTCCGTAAC
TTTCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCACG
GCGGGAGACAGGTCTCACCGGTCGTGTGTTGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCCGCGCGCT
CCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGCGCCCCGCCCCAGGACCCGCCTAGGAGC
GCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCGGCCCGCCGC
GCTTCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTTCGGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAG
ACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGA
AGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGCTGG
CCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGCGC
TAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACAC
TCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGATTATGATCC
TCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAAC
ACCCTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCAC
ATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCC
ATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGA
TAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAA
GGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCC
GCCTTCATGTACGTCTTCTATGTATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTG
AAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCTCAACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACG
GAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTG
AATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAG
CCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGA
CATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATG

AGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTCAACACAAAGAT
TCTGACCTTAAATGCAACCATTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGAT
GCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCT
GTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTA
TTGGTGTAAAGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCT
GAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGT
CCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACCTTTCCCCACGTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTC
ATTTGCTTTGGAAGTTTTAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACT
CTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAA
GATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGT
AAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAA
TACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTCAATTGTGGTCATAGCACCTA
ACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTAT
GATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGA
CTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTT
TTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTGCTTG
GGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGG
GAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGA
TTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAAT
TTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAG
ATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGA
CATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTCAAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTGT
TGTCAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATA
TGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAACATTAAATAT
AATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGC
CTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG
CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGGCGCCTGATGCGGTAT
TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGT
ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTT
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
GCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA

GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTT
 ATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
 CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTA
 CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATC
 ACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGT
 CATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGC
 CATATTCAACGGGAAACGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTA
 TATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCG
 CTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCG
 TTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGC
 CTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCAC
 TGCATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTG
 AAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGTTTG
 TAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAAT
 GAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGT
 TGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC GGATT CAGTCGT
 CACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGG
 TTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCT
 ATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATA
 TGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTT
 TTCTAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGA
 CCCCCTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTG
 CTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAG
 AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
 CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
 CTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT
 CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCG
 GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
 GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTG
 ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
 CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

Таблица 5: Компоненты последовательности конструкции (SEQ ID NO: 100)

Компоненты	Положение в конструкции
5' ITR	12-130
Сайт клонирования	131-147
Промотор RBP7	148-1244
Минимальный промотор hGJB2	1245-1372

Сайт клонирования	1373-1381
Синтетический штрихкод	1382-1389
5'UTR	1390-1751
GJB2 (экзон2)	1763-2440
3xFLAG	2453-2518
3'UTR (экзон2)	2522-3928
bGHpA	3950-4174
Сайт клонирования	4175-4208
3'ITR	4209-4338

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 103)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
 CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
 AACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGGTAAATAGCTTCCAACGTTT
 CCACCCACCAGCCCTTGCACTCCTGTACTGGCCCTGAGCTTTCTAGTCTTGAC
 TGAAGAGCGGGGAGGCAATGTGGTCTCTCCTGGTGCCTGTCCCGAGGAAGGCCTG
 CTCCGCTTCCCCGGAGGAGTCTTCAAAGGATGGAGGTAATTAATAAAAACAACCCC
 TGTACCTCCTCTAAGTGGTCATTAATTAATAAAGAACCTCCAGGCTCCTATAGGAGA
 GGTCTGTGCACCCCGCGGGCTATGAGAAGGCTGGATCACCCAGAAAGACTGAGGAT
 GTGTCCTGGCAAAAACACAGCCTGCCCCCTCACACTGCTCCCCACGGGTGCACTAGGG
 AGGAAGAGTTCCCTCGAGGGCCTGAGCAGGCGCCCCACACCTGCACCCGTGCAGAG
 GGGGCTGGGCCCCGCCCTCTGCGCTCCCGAGGGAGAGCCCTACCCCTGCATCCCCGG
 TACCCCGTTCCCTCCAAGGGCCGAAAGAGGGCCCCGCGCACTGTGCACTTCTTAGG
 GGTCCCCACCCCTGCGCCCCCGCCACGGGAAAAAGGTCCCCGCTCTGCGCATCCGGC
 CCCGGAGGGACAGCCCCGGTCTGCACTCCTTGCTCCTCAGGGGGACGGTCCGCGCC
 CAGCGGCTAGTGCGCCCCGGGTAGGTGGGGGCGGGGGGCTCGTCGAGTGACAGCGC
 TCGCCTCCCGCAGCCCGCCCGAGCCGCGTCAGGGCAGAAGCTCTGAGGACCCAGAG
 GCCGGGCGCGCTCCGCCCCGCGGCGCCGCCCTCCGTAACCTTCCCAGTCTCCGAGG
 GAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCACGGCGGGAGACAGGTCTC
 ACCGGTTCGTGGGTGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCGCGCGCTCCTCTCCCCGACTCGG
 AGCCCCCTCGGCGGCGCCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAGCGCAGGAGCCCCAGCGC
 AGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCCGGCCCCGCGCGCTTCTCTCCCGACGCA
 GTTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGAGACCCGCGTCCTCAGGA
 CGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGGAAGGCAGCCCGAACAG
 CGCTACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCCTGGCCATGCACCTGGGACT
 GCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGCGCTAGCCACCATGGATTG
 GGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACACTCCACCAGCATTGGAA
 AGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGATTATGATCCTCGTTGTGGCTGCAAA
 GGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAACACCCTGCAGCCAGGCT

GCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCACATCCGGCTATGGGCCC
TGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGCCATGCACGTGGCCTACC
GGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAGATAAAGAGTGAATTTAA
GGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGAAGGCTCCCTGTGGTGGA
CCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGCCGCCTTCATGTACGTCTT
CTATGTCATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTGAAGTGCAACGCCTGGCC
TTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCAGGCCACGGAGAAGACTGTCTTCAC
AGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTGAATGTCACTGAATTGTGT
TATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAGCCAGTTGGATCCCAGGGCT
GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGA
CGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATGAGGCAACCCGTGCTCAGCT
GTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCCAACACAAAGATTCTGACCTTAAATGCAACC
ATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGATGCCACAATGGAGCTCTGCT
CCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCTGTCTTAATTTTCTTTCACTT
AAGTTAGTTCCACTGAGACCCCAGGCTGTTAGGGGTTATTGGTGTAAGGTACTTTCA
TATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCTGAGGACAAGAGAAAAAAG
CCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGTCCTCCTGGGGTTCTTTTTGC
CAACTTTCCCCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTCATTTGCTTTGGAAGTTTTAA
TCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACTCTGTTACACTTTTTTGGAAGT
GAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAAGATGTTCTGGATACCATTAT
ATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGTAAATGGTATGTCATTGCTA
CTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAATACTTTGCAGCACAGCTGAG
AGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAGCACCTAACAACATTGTAGCCTCAATC
GAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTATGATAGCAAATGGCCTCATG
TCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGACTGGATGTACCACCAACTA
CTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTTTTCCATGACTGTGGTAGCC
AGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTCGCTTGGGAATTTTATTGACACAGT
ACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGGGAGAAGTTTCTGTCGTAA
AAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGATTAAAGATGAGCTTTGTCT
ACTTCAAAAGTTTGTTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAATTTTTTAAGTGAAAATATAG
CTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAGATAAATATTGAGCAGATCT
ATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGACATGGTTTCCAAAAAATGG
TACTCCACATATTTCAAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTGTTGTCAAGAATAGCATTGTA
AAAGCATTTTGTAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATATGCTTGTAATAAATAAT
TTTGTAATGTATCAAATACATTTAAAACATTAAAATATAATCTCTATAATAAGAGCT
CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCC
CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATG
AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG
GGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCC

TAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC
GACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGC
GGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCAT
TAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC
CTAGCGCCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCC
CCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA
CCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTG
ATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGG
ATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC
GCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATC
TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCG
CCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCC
GGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAA
GGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAACAATAAACTGTCTG
CTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCG
AGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGC
GATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGC
GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATG
AGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATT
TTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCGGAAAAACAG
CATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGG
CAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGA
TCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTTGGTTGATGC
GAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAA
TGCATAAACTTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACT
TGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGT
CGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTT
TTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATG
AATAAATTGCAGTTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCAC
CGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGG
TAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACA
CAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCT
ATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGC

GGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT
ATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

Таблица 6: Компоненты последовательности конструкции (SEQ ID NO: 103)

Компоненты	Положение в конструкции
5' ITR	12-130
Сайт клонирования	131-147
промотор GJB66	148-882
минимальный промотор hGJB2	883-1010
Сайт клонирования	1011-1019
Синтетический штрихкод	1020-1027
5' UTR	1028-1389
GJB2 (экзон2)	1401-2078
3xFLAG	2091-2156
3' UTR (экзон2)	2160-3566
bGHpA	3588-3812
Сайт клонирования	3813-3846
3' ITR	3847-3976

Иллюстративная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 106)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGG
CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGCCGCACGCGTGGTTGTACAGGAGATAGTCA
GGGAATTAGTAATTTTCAAAGAGGTGACTTTGAATTCAAACCTAAATATCATCTTCA
GCTGAAACAAAGAAGGGGTGCAGTTATGAGGAAGTGACCAGGTAAAGCATGGCAA
ACAAAGGTAAAGTTTGTATGCGTATTTAAGTCAGAGCCCTCTCCATTGATAAGAGT
TTCCAGTAATTTAGTGCCATCCTTTTCTTGCTATAGAGTTCTCGTCTCTATCTGAGCA
CGCAAAAATAACATGCTTTCTTGCTTTCTTGAAGTTGGGCATGGCCATTGACTTGCCT
TAGCCCATATTTTCTGTGAAGTGGTCTTCAAAAACCTATATTTCTGCCATAGAGTCA
CTTACTTAACCTGCCCTATTTAAAGGGGCTAATGCCTGATAGAATGTCGCTGCATAA
CTCCATCTGTGTGTGGTCCCTGCATCCATGACAACCAAAACCCAGATGCAGAAATTG
TTCCTAATCACATAGATTACCCTAGAAACCGGAAGGGCCTTGAAGTCAAAGCATTC
AGAGAACATGCTGAACAAATTGAATTTGCAGTTTATCTGGCCAGGGAGGATGGAGA
GGGGATGGGCACTTGGTCTGAGTATTTTTGTCTTCTCATTCCAACAGAAATTACTAG
ATTTACCAAAAAATCTACAAGTGGTAGTGTGATAGAGTCAGGCAGAGGAATTGACC
ATAGATAAGGTGCTCAGGACTCCTAGAGTCAGCTTCTGGTATGTGAGAAAGAAGTG
AGAACAGAGCCCATGGCATATGAAGAAGATATTACAGAAAAAAGAAAGCTGCCTTC

CACGCAAATCATTCTTTACAAAGGCTTGTTAACTCCTGCAGTGCCAAGAAGCTGAA
TGCAGCGGCAGACATCCTGGTTCGGGCCCCAGGAAGCTCAGCCGGGTTTAATGTGG
ATGAGGGTTTAATGATGTACACGCAGAAAGTGTTTTGACAAATGAAGAAGGTCCTCA
TTCTTGGAACATGTGCCGGTTCTCCGAGGGAACTCCTAAAAGGCTGTAAGCTCATGT
AGGAAAAGCTGAGCTAGATTCTTAAGGGCAGAGATGTGCTCACATTTCTTTGCATCC
CTAGTTCCCAGCACAGTGCAAGGCGCTGCAAACATTTGCTGAACCCAGGGTCTCGTG
TCTTGACTGTCCAGCAGAGGCCGCTCTGGGCGGGGCTCTCGGGACCTGAGGGCTG
AGAGAAGGAAGGCCAGGGGGTGGCCCAGTCATCGCCGCGGGGCCCCGGGTGGGAGG
GGTTTGGCAGCGGCAGGCGCGGCGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGCCCGGGAA
GCTCTGAGGACCCAGAGGCCGGGCGCGCTCCGCCCCGCGGCGCCGCCCCCTCCGTAA
CTTTCCCAGTCTCCGAGGGAAGAGGCGGGGTGTGGGGTGCGGTTAAAAGGCGCCAC
GGCGGGAGACAGGTCTCACCGGTGCAAACCTGGTTGCGGCCCCGCAGCGCCCCGCGCG
CTCCTCTCCCCGACTCGGAGCCCCTCGGCGGCGCCCGGCCAGGACCCGCCTAGGAG
CGCAGGAGCCCCAGCGCAGAGACCCCAACGCCGAGACCCCCGCCCCGGCCCCGCGG
CGCTTCCTCCCGACGCAGTTTAGGACCCTTGTTTCGCGAAGAGGTGGTGTGCGGCTGA
GACCCGCGTCCTCAGGACGGTTCCATCAGTGCCTCGATCCTGCCCCACTGGAGGAGG
AAGGCAGCCCGAACAGCGCTCACCTAACTAACAGCTGCTGAGAGCTGGGTTCGTG
GCCATGCACCTGGGACTGCCTTGAGAAGCGTGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAAGCG
CTAGCCACCATGGATTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGGGTGTGAACAAACA
CTCCACCAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACCGTCCTCTTCATTTTTTCGCATTATGATC
CTCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGTGTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTTGTCTGCAA
CACCTTGCAGCCAGGCTGCAAGAACGTGTGCTACGATCACTACTTCCCCATCTCCCA
CATCCGGCTATGGGCCCTGCAGCTGATCTTCGTGTCCACGCCAGCGCTCCTAGTGGC
CATGCACGTGGCCTACCGGAGACATGAGAAGAAGAGGAAGTTCATCAAGGGGGAG
ATAAAGAGTGAATTTAAGGACATCGAGGAGATCAAAACCCAGAAGGTCCGCATCGA
AGGCTCCCTGTGGTGGACCTACACAAGCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTCGAAGC
CGCCTTCATGTACGTCTTCTATGTATGTACGACGGCTTCTCCATGCAGCGGCTGGTG
AAGTGCAACGCCTGGCCTTGTCCCAACACTGTGGACTGCTTTGTGTCCCGGCCACG
GAGAAGACTGTCTTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGTCTGGAATTTGCATCCTGCTG
AATGTCACTGAATTGTGTTATTTGCTAATTAGATATTGTTCTGGGAAGTCAAAAAAG
CCAGTTGGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGA
CATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGAAATAGACAGCATGAGAGGGATG
AGGCAACCCGTGCTCAGCTGTCAAGGCTCAGTCGCTAGCATTTCCTAACACAAAGAT
TCTGACCTTAAATGCAACCATTTGAAACCCCTGTAGGCCTCAGGTGAAACTCCAGAT
GCCACAATGGAGCTCTGCTCCCCTAAAGCCTCAAAACAAAGGCCTAATTCTATGCCT
GTCTTAATTTTCTTTCACTTAAGTTAGTTCCACTGAGACCCAGGCTGTTAGGGGTTA
TTGGTGTAAAGTACTTTTCATATTTTAAACAGAGGATATCGGCATTTGTTTCTTTCTCT
GAGGACAAGAGAAAAAAGCCAGGTTCCACAGAGGACACAGAGAAGGTTTGGGTGT
CCTCCTGGGGTTCTTTTTGCCAACCTTTCACGTTAAAGGTGAACATTGGTTCTTTC
ATTTGCTTTGGAAGTTTAAATCTCTAACAGTGGACAAAGTTACCAGTGCCTTAAACT

CTGTTACACTTTTTGGAAGTGAAAACCTTTGTAGTATGATAGGTTATTTTGATGTAAA
GATGTTCTGGATACCATTATATGTTCCCCCTGTTTCAGAGGCTCAGATTGTAATATGT
AAATGGTATGTCATTCGCTACTATGATTTAATTTGAAATATGGTCTTTTGGTTATGAA
TACTTTGCAGCACAGCTGAGAGGCTGTCTGTTGTATTTCATTGTGGTCATAGCACCTA
ACAACATTGTAGCCTCAATCGAGTGAGACAGACTAGAAGTTCCTAGTGATGGCTTAT
GATAGCAAATGGCCTCATGTCAAATATTTAGATGTAATTTTGTGTAAGAAATACAGA
CTGGATGTACCACCAACTACTACCTGTAATGACAGGCCTGTCCAACACATCTCCCTT
TTCCATGACTGTGGTAGCCAGCATCGGAAAGAACGCTGATTTAAAGAGGTGCTTG
GGAATTTTATTGACACAGTACCATTTAATGGGGAGGACAAAATGGGGCAGGGGAGG
GAGAAGTTTCTGTCGTTAAAAACAGATTTGGAAAGACTGGACTCTAAAGTCTGTTGA
TTAAAGATGAGCTTTGTCTACTTCAAAAGTTTGTGTTGCTTACCCCTTCAGCCTCCAAT
TTTTTAAGTGAAAATATAGCTAATAACATGTGAAAAGAATAGAAGCTAAGGTTTAG
ATAAATATTGAGCAGATCTATAGGAAGATTGAACCTGAATATTGCCATTATGCTTGA
CATGGTTTCCAAAAAATGGTACTCCACATATTTTCAGTGAGGGTAAGTATTTTCCTGT
TGTCAGAATAGCATTGTAAAAGCATTTTGTAAATAATAAAGAATAGCTTTAATGATA
TGCTTGTAACATAAATAATTTTGTAAATGTATCAAATACATTTAAACATTAAATAT
AATCTCTATAATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGC
CTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG
CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGG
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGGCGCCTGATGCGGTAT
TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGT
ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTT
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
GCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTT
ATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACA
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTA
CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTTCACCGTCATC
ACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGT
CATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGC
CATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTA
TATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCG

CTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCG
 TTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGC
 CTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCAC
 TGCATCCCCGGAACAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTG
 AAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGTTTG
 TAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAAT
 GAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGT
 TGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGT
 CACTCATGGTGATTTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGG
 TTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCT
 ATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATA
 TGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTT
 TTCTAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGA
 CCCCCTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTG
 CTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAG
 AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
 CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
 CTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT
 CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCG
 GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
 GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTG
 ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
 CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

Таблица 7: Компоненты последовательности конструкции (SEQ ID NO: 106)

Компоненты	Положение в конструкции
5'ITR	12-130
Сайт клонирования	131-147
Промотор PARM1	148-1463
Минимальный промотор hGJB2	1464-1591
Сайт клонирования	1592-1600
Синтетический штрихкод	1601-1608
5'UTR	1609-1970
GJB2 (экзон2)	1982-2659
3xFLAG	2672-2737
3'UTR (экзон2)	2741-4147
bGHpA	4169-4393

Сайт клонирования	4394-4427
3' ITR	4428-4557

Композиции с Множеством AAV Конструкций

[0287] В настоящем раскрытии признается, что некоторые кодирующие последовательности, кодирующие белок (например белок коннексин 26), можно доставлять путем деления кодирующей последовательности на множество частей, каждая из которых включена в другую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции или системы, содержащие по меньшей мере две разные конструкции (например две, три, четыре, пять или шесть). В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух разных конструкций содержит кодирующую последовательность, которая кодирует другую часть области кодирования (например, кодирующую белок-мишень (например белок-мишень внутреннего уха, например белок коннексин 26)), причем каждая из закодированных частей имеет по меньшей мере 10 аминокислот (например по меньшей мере примерно 10 аминокислот, по меньшей мере примерно 20 аминокислот, по меньшей мере примерно 30 аминокислот, по меньшей мере примерно 60 аминокислот, по меньшей мере примерно 70 аминокислот, по меньшей мере примерно 80 аминокислот, по меньшей мере примерно 90 аминокислот, по меньшей мере примерно 100 аминокислот, по меньшей мере примерно 110 аминокислот, по меньшей мере примерно 120 аминокислот, по меньшей мере примерно 130 аминокислот, по меньшей мере примерно 140 аминокислот, по меньшей мере примерно 150 аминокислот, по меньшей мере примерно 160 аминокислот, по меньшей мере примерно 170 аминокислот, по меньшей мере примерно 180 аминокислот, по меньшей мере примерно 190 аминокислот, по меньшей мере примерно 200 аминокислот, по меньшей мере примерно 210 аминокислот, по меньшей мере примерно 220 аминокислот, по меньшей мере примерно 230 аминокислот, по меньшей мере примерно 240 аминокислот, по меньшей мере примерно 250 аминокислот или по меньшей мере примерно 260 аминокислот), причем аминокислотная последовательность каждой из закодированных частей может необязательно частично перекрываться с аминокислотной последовательностью другой из закодированных частей; ни одна конструкция из по меньшей мере двух разных конструкций не кодирует активный белок-мишень; и при введении в клетку субъекта (например в клетку животного, например в клетку примата, например в клетку человека) по меньшей мере две разные конструкции подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, причем гекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует активный белок-мишень (например генный продукт, закодированный геном GJB2 или его характеристической частью). В некоторых вариантах осуществления одна из конструкций нуклеиновой кислоты может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует часть белка-мишени (например белка-мишени внутреннего уха, например белка коннексина 26), причем закодированная часть составляет самое большее примерно 260 аминокислот (например самое большее примерно 10 аминокислот, самое большее примерно 20 аминокислот, самое большее примерно 30 аминокислот, самое большее примерно 60 аминокислот, самое большее примерно 70

аминокислот, самое большее примерно 80 аминокислот, самое большее примерно 90 аминокислот, самое большее примерно 100 аминокислот, самое большее примерно 110 аминокислот, самое большее примерно 120 аминокислот, самое большее примерно 130 аминокислот, самое большее примерно 140 аминокислот, самое большее примерно 150 аминокислот, самое большее примерно 160 аминокислот, самое большее примерно 170 аминокислот, самое большее примерно 180 аминокислот, самое большее примерно 190 аминокислот, самое большее примерно 200 аминокислот, самое большее примерно 210 аминокислот, самое большее примерно 220 аминокислот, самое большее примерно 230 аминокислот, самое большее примерно 240 аминокислот, самое большее примерно 250 аминокислот или самое большее примерно 260 аминокислот).

[0288] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из конструкций содержит нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК-мишени (например геномной ДНК-мишени внутреннего уха, например геномной ДНК GJB2), и не содержит интронной последовательности, которая натуральным образом имеется между двумя соседними экзонами.

[0289] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность закодированной части каждой из конструкций не перекрывается, даже частично, с аминокислотной последовательностью другой из закодированных частей. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность закодированной части конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью закодированной части другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность закодированной части каждой конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью закодированной части по меньшей мере одной другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от примерно 10 аминокислотных остатков до примерно 260 аминокислот или любой из поддиапазонов этого диапазона (например примерно 10 аминокислот, примерно 20 аминокислот, примерно 30 аминокислот, примерно 60 аминокислот, примерно 70 аминокислот, примерно 80 аминокислот, примерно 90 аминокислот, примерно 100 аминокислот, примерно 110 аминокислот, примерно 120 аминокислот, примерно 130 аминокислот, примерно 140 аминокислот, примерно 150 аминокислот, примерно 160 аминокислот, примерно 170 аминокислот, примерно 180 аминокислот, примерно 190 аминокислот, примерно 200 аминокислот, примерно 210 аминокислот, примерно 220 аминокислот, примерно 230 аминокислот, примерно 240 аминокислот, примерно 250 аминокислот или примерно 260 аминокислот).

[0290] В некоторых примерах нужный генный продукт (например терапевтический генный продукт) закодирован по меньшей мере двумя разными конструкциями. В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух разных конструкций содержит другой сегмент интрона, причем интрон содержит нуклеотидную последовательность интрона, которая находится в геномной ДНК-мишени (например в

геномной ДНК-мишени клетки внутреннего уха (например геномной ДНК GJB2) (например любого из иллюстративных интронов в SEQ ID NO: 5, описанной в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления разные сегменты интрона перекрываются. В некоторых вариантах осуществления разные сегменты интрона перекрываются в последовательности самое большее примерно на 3000 нуклеотидов (например самое большее примерно 100 нуклеотидов, самое большее примерно 200 нуклеотидов, самое большее примерно 300 нуклеотидов, самое большее примерно 600 нуклеотидов, самое большее примерно 700 нуклеотидов, самое большее примерно 800 нуклеотидов, самое большее примерно 900 нуклеотидов, самое большее примерно 1000 нуклеотидов, самое большее примерно 1100 нуклеотидов, самое большее примерно 1200 нуклеотидов, самое большее примерно 1300 нуклеотидов, самое большее примерно 1400 нуклеотидов, самое большее примерно 1500 нуклеотидов, самое большее примерно 1600 нуклеотидов, самое большее примерно 1700 нуклеотидов, самое большее примерно 1800 нуклеотидов, самое большее примерно 1900 нуклеотидов, самое большее примерно 2000 нуклеотидов, самое большее примерно 2100 нуклеотидов, самое большее примерно 2200 нуклеотидов, самое большее примерно 2300 нуклеотидов, самое большее примерно 2400 нуклеотидов, самое большее примерно 2500 нуклеотидов, самое большее примерно 2600 нуклеотидов, самое большее примерно 2700 нуклеотидов, самое большее примерно 2800 нуклеотидов, самое большее примерно 2900 нуклеотидов или самое большее примерно 3000 нуклеотидов) в длину. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся нуклеотидная последовательность в любых двух разных конструкциях может содержать часть или все из одного или нескольких экзонов гена-мишени (например гена-мишени клетки внутреннего уха (например гена GJB2) (например любой один или несколько иллюстративных экзонов в SEQ ID NO: 5, описанной в настоящем документе).

[0291] В некоторых вариантах осуществления композиция или система представляет собой или содержит две, три, четыре или пять разных конструкций. В композициях, в которых число разных конструкций в композиции составляет два, первая из двух разных конструкций может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует N-концевую часть белка (например белка коннексина 26), которую можно называть передней частью, первой конструкцией или 5'-частью (например N-концевой частью белка клетки внутреннего уха, например N-концевой частью белка коннексина 26). В некоторых примерах N-концевая часть гена-мишени имеет длину по меньшей мере примерно 10 аминокислот (например по меньшей мере примерно 10 аминокислот, по меньшей мере примерно 20 аминокислот, по меньшей мере примерно 30 аминокислот, по меньшей мере примерно 60 аминокислот, по меньшей мере примерно 70 аминокислот, по меньшей мере примерно 80 аминокислот, по меньшей мере примерно 90 аминокислот, по меньшей мере примерно 100 аминокислот, по меньшей мере примерно 110 аминокислот, по меньшей мере примерно 120 аминокислот, по меньшей мере примерно 130 аминокислот, по меньшей мере примерно 140 аминокислот, по меньшей мере примерно 150 аминокислот, по меньшей мере примерно 160 аминокислот, по меньшей мере примерно 170 аминокислот, по меньшей мере

примерно 180 аминокислот, по меньшей мере примерно 190 аминокислот, по меньшей мере примерно 200 аминокислот, по меньшей мере примерно 210 аминокислот, по меньшей мере примерно 220 аминокислот, по меньшей мере примерно 230 аминокислот, по меньшей мере примерно 240 аминокислот, по меньшей мере примерно 250 аминокислот или по меньшей мере примерно 260 аминокислот). В некоторых примерах первая конструкция содержит один или оба элемента из промотора (например любой из промоторов, описанных в настоящем документе или известных в данной области) и последовательности Козака (например любую из иллюстративных последовательностей Козака, описанных в настоящем документе или известных в данной области). В некоторых примерах первая конструкция содержит промотор, который представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор или тканеспецифический промотор. В некоторых примерах вторая из двух разных конструкций содержит кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка, которую можно называть концевой частью, второй конструкцией или 3'-частью (например С-концевой частью белка-мишени клетки внутреннего уха, например С-концевой частью белка коннексина 26). В некоторых примерах С-концевая часть белка-мишени имеет длину по меньшей мере примерно 10 аминокислот (например по меньшей мере примерно 10 аминокислот, по меньшей мере примерно 20 аминокислот, по меньшей мере примерно 30 аминокислот, по меньшей мере примерно 60 аминокислот, по меньшей мере примерно 70 аминокислот, по меньшей мере примерно 80 аминокислот, по меньшей мере примерно 90 аминокислот, по меньшей мере примерно 100 аминокислот, по меньшей мере примерно 110 аминокислот, по меньшей мере примерно 120 аминокислот, по меньшей мере примерно 130 аминокислот, по меньшей мере примерно 140 аминокислот, по меньшей мере примерно 150 аминокислот, по меньшей мере примерно 160 аминокислот, по меньшей мере примерно 170 аминокислот, по меньшей мере примерно 180 аминокислот, по меньшей мере примерно 190 аминокислот, по меньшей мере примерно 200 аминокислот, по меньшей мере примерно 210 аминокислот, по меньшей мере примерно 220 аминокислот, по меньшей мере примерно 230 аминокислот, по меньшей мере примерно 240 аминокислот, по меньшей мере примерно 250 аминокислот или по меньшей мере примерно 260 аминокислот). В некоторых примерах вторая конструкция дополнительно содержит последовательность поли(А).

[0292] В некоторых примерах, когда число разных конструкций в композиции составляет две, N-концевая часть, закодированная одной из двух конструкций, может содержать часть, содержащую от аминокислоты в положении 1 до примерно аминокислоты в положении 260 или любой поддиапазон этого диапазона (например от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 70, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 80, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 90, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно

аминокислоты 100, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 110, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 120, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 130, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 140, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 150, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 160, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 170, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 180, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 190, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 200, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 210, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 220, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 230, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 240, от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 250 или от аминокислоты 1 до по меньшей мере примерно аминокислоты 260) белка-мишени клетки внутреннего уха (например SEQ ID NO: 7). В некоторых примерах, когда число разных конструкций в композиции составляет две, N-концевая часть белка-предшественника-мишени клетки внутреннего уха может содержать часть, содержащую самое большее от аминокислоты в положении 1 до аминокислоты в положении 260 или любой поддиапазон этого диапазона (например от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 70, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 80, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 90, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 100, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 110, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 120, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 130, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 140, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 150, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 160, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 170, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 180, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 190, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 200, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 210, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 220, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 230, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 240, от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 250 или от аминокислоты 1 до самое большее примерно аминокислоты 260) белка-мишени клетки внутреннего уха (например SEQ ID NO: 7)

[0293] В некоторых примерах, когда число разных конструкций в композиции составляет две, C-концевая часть, закодированная одной из двух конструкций, может

содержать часть, включающую в себя от конечной аминокислоты (например аминокислоты примерно в положении 260) до аминокислоты примерно в положении 1 или любой поддиапазон этого диапазона (например от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 10, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 20, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 30, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 60, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 70, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 80, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 90, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 100, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 110, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 120, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 130, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 140, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 150, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 160, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 170, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 180, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 190, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 200, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 210, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 220, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 230, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 240, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 250, от аминокислоты 260 до по меньшей мере примерно аминокислоты 260) белка-мишени клетки внутреннего уха (например SEQ ID NO: 7). В некоторых примерах, когда число разных конструкций в композиции составляет две, С-концевая часть белка-предшественника-мишени клетки внутреннего уха может содержать часть, включающую в себя от конечной аминокислоты (например аминокислоты примерно в положении 2600) до самое большее аминокислоты примерно в положении 1 или любой поддиапазон этого диапазона (например от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 10, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 20, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 30, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 60, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 70, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 80, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 90, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 100, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 110, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 120, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 130, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 140, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 150, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 160, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 170, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 180,

от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 190, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 200, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 210, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 220, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 230, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 240, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 250, от аминокислоты 260 до самое большее примерно аминокислоты 260) или последовательность любой длины между ними белками клетки внутреннего уха (например SEQ ID NO: 7).

[0294] В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга участвуют в транс-сплайсинге. В некоторых вариантах осуществления донорный сайт сплайсинга (Trapani et al., EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки) следует за кодирующей последовательностью в N-концевой конструкции. В С-концевой конструкции акцепторный сайт сплайсинга может быть субклонирован непосредственно перед кодирующей последовательностью для GJB2. В некоторых вариантах осуществления в кодирующую последовательность можно ввести молчащую мутацию, создающую дополнительный сайт для рестрикционного расщепления.

[0295] В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, представленных в настоящем документе, может быть включена в композицию, подходящую для введения животному для улучшения симптомов, связанных с синдромальной и/или несиндромальной потерей слуха.

Фармацевтические Композиции

[0296] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлены фармацевтические композиции. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены композиции, подходящие для введения животному для улучшения симптомов, связанных с синдромальной и/или несиндромальной потерей слуха.

[0297] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать, например полинуклеотид, например одну или несколько конструкций, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать одну или несколько частиц AAV, например одну или несколько гAAV конструкций, инкапсулированных одним или несколькими капсидами серотипа AAV, как описано в настоящем документе.

[0298] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько фармацевтически или физиологически приемлемый носителей, разбавителей или вспомогательных средств. В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя растворители, диспергенты, покрытия, антибактериальные средства, противогрибковые средства и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. В любую из композиций, описанных в настоящем документе, также можно включить дополнительные активные соединения. Такие композиции могут содержать один или несколько буферов, таких как

нейтральный буферный раствор, фосфатный буферный раствор и тому подобное; один или несколько углеводов, таких как глюкоза, манноза, сахароза и декстран; маннит; один или несколько белков, полипептидов или аминокислот, таких как глицин; один или несколько антиоксидантов; одно или несколько хелатирующих средств, таких как EDTA или глутатион; и/или один или несколько консервантов. В некоторых вариантах осуществления готовые формы представлены в виде дозированных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, высвобождающие лекарственное средство капсулы и тому подобное.

[0299] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему раскрытию составлены для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему раскрытию составлены для введения внутрь улитки. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена так, чтобы она содержала липидные наночастицы, полимерные наночастицы, миникольцевую ДНК и/или CELiD ДНК.

[0300] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, составлена в виде стерильной суспензии для введения внутрь улитки. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве геномов вектора (vg) на миллилитр (мл) по меньшей мере 1E11, по меньшей мере 5E11, по меньшей мере 1E12, по меньшей мере 5E12, по меньшей мере 1E13, по меньшей мере 2E13, по меньшей мере 3E13, по меньшей мере 4E13, по меньшей мере 5E13, по меньшей мере 6E13, по меньшей мере 7E13, по меньшей мере 8E13, по меньшей мере 9E13 или по меньшей мере 1E14 геномы вектора (vg) на миллилитр (мл). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве геномов вектора (vg) на миллилитр (мл) самое большее 1E15, самое большее 5E14, самое большее 1E14, самое большее 5E13, самое большее 1E13, самое большее 9E12, самое большее 8E12, самое большее 7E12, самое большее 6E12, самое большее 5E12, самое большее 4E12, самое большее 3E12, самое большее 2E12 или самое большее 1E12. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве от 1E12 до 1E13, от 5E12 до 5E13 или от 1E13 до 2E13.

[0301] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена так, чтобы она содержала синтетический раствор перилимфы. Например, в некоторых вариантах осуществления синтетический раствор перилимфы содержит 20-200 mM NaCl; 1-5 mM KCl; 0,1-10 mM CaCl₂; 1-10 mM глюкозы; и 2-50 mM HEPES, с pH между примерно 6 и примерно 9. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена так, чтобы она содержала физиологически приемлемый раствор. Например, в некоторых вариантах осуществления физиологически приемлемый раствор содержит коммерчески доступный 1xPBS с плюроновой кислотой F68, приготовленный с итоговой концентрацией: 8,10 mM двухосновного фосфата натрия, 1,5 mM монофосфата калия, 2,7 mM хлорида калия, 172 mM хлорида натрия и 0,001% плюроновая кислота F68). В некоторых вариантах осуществления используют альтернативные плюроновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления используют альтернативные концентрации ионов.

[0302] В некоторых вариантах осуществления любая из фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать одно или несколько средств, которые способствуют поступлению нуклеиновой кислоты или любой из конструкций, описанных в настоящем документе, в клетку млекопитающего (например липосому или катионный липид). В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может быть составлена с использованием натуральных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из композиций, описанных в настоящем документе, могут включать без ограничения DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif.), готовые формы из Mirus Bio (Madison, Wis.) и Roche Madison (Madison, Wis.), готовые формы полимеров PhaseRX, такие как без ограничения SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Seattle, Wash.), DMRI/DOPE, полксамер, добавка VAXFECTIN® от Vical (San Diego, Calif.), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Pasadena, Calif.), дендримеры и полимеры поли(молочно-гликолевой кислоты) (PLGA), полимеры RONDEL™ (доставка наночастиц РНКи/олигонуклеотидов) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, Calif.) и коблок-полимеры, чувствительные к pH, такие как без ограничения коблок-полимеры, производимые PhaseRX (Seattle, Wash.). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность доставки олигонуклеотидов *in vivo* в клетку млекопитающего (см., например deFougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5715-5721, 2007, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0303] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель (например фосфатный буферный раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). При получении готовой формы растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной готовой формой и в терапевтически эффективном количестве. Готовые формы легко вводить в виде множества дозированных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, высвобождающие лекарственное средство капсулы и тому подобное.

[0304] В некоторых вариантах осуществления композицию, представленную в настоящем документе, можно, например, составить так, чтобы она была совместима с предназначенным для нее путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например введение в улитку). В некоторых вариантах осуществления представленная композиция содержит одну конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления представленная композиция содержит два или более разные конструкции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует белок коннексин 26 и/или его функциональную

характеристическую часть. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат одну конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует белок коннексин 26 и/или его функциональную характеристическую часть, при введении которой в клетку млекопитающего эта кодирующая последовательность встраивается в геном клетки млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая по меньшей мере две разные конструкции, например конструкции, содержащие кодирующие последовательности, которые кодируют разные части белка коннексина 26, причем конструкции могут быть объединены так, чтобы получить последовательность, кодирующую активный белок коннексин 26 (например полноразмерный белок коннексин 26) в клетке млекопитающего, и таким образом лечить связанную синдромальную или несиндромальную нейросенсорную потерю слуха у нуждающегося в этом субъекта.

[0305] Также представлены наборы, содержащие любые композиции, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать твердую композицию (например лиофилизированную композицию, содержащую по меньшей мере две разные конструкции, описанные в настоящем документе) и жидкость для растворения лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать предварительно заправленный шприц, содержащий любые композиции, описанные в настоящем документе.

[0306] В некоторых вариантах осуществления набор содержит флакон, содержащий любые композиции, описанные в настоящем документе (например составленные как водная композиция, например водная фармацевтическая композиция).

[0307] В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции для осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе.

Генетически Модифицированные Клетки

[0308] В настоящем раскрытии также представлена клетка (например клетка животного, например клетка млекопитающего, например клетка примата, например клетка человека), которая содержит любые из нуклеиновых кислот, конструкций или композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клеткой животного является клетка человека (например поддерживающая клетка человека или волосковая клетка человека). В других вариантах осуществления клеткой животного является клетка млекопитающего, отличного от человека (например клетка обезьяны, клетка кошачьих, клетка псовых и так далее). Специалисту в данной области будет понятно, что нуклеиновые кислоты и конструкции, описанные в настоящем документе, можно вводить в клетку любого животного (например в поддерживающие или волосковые клетки любого животного, подходящего для ветеринарного вмешательства). В настоящем документе описаны неограничивающие примеры конструкций и способов введения конструкций в клетки животного.

[0309] В некоторых вариантах осуществления клеткой животного может быть любая клетка внутреннего уха, включая волосковые и/или поддерживающие клетки.

Неограничивающие примеры таких клеток включают: клетки Гензена, клетки Дейтерса, клетки эндолимфатического мешка и протока, переходные клетки сферического мешочка, овального мешочка и ампулы, внутренние и наружные волосковые клетки, клетки спиральной связки, клетки спирального ганглия, клетки спирального выступа, наружные клетки сферического мешочка, краевые клетки, промежуточные клетки, базальные клетки, внутренние столбовые клетки, наружные столбовые клетки, клетки Клаудиуса, внутренние пограничные клетки, внутренние фаланговые клетки или клетки сосудистой полосы.

[0310] В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются специализированные клетки улитки. В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются волосковые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются кохлеарные внутренние волосковые клетки или кохлеарные наружные волосковые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются кохлеарные внутренние волосковые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются кохлеарные наружные волосковые клетки.

[0311] В некоторых вариантах осуществления клетками животного являются клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетки животного относятся к типу, который эндогенно присутствует у животного, например у примата и/или человека. В некоторых вариантах осуществления клетки животного представляют собой аутологичные клетки, полученные у животного и культивируемые *ex vivo*.

Способы

[0312] Среди прочего, в настоящем раскрытии представлен способ. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо (например в улитку) субъекта. Например, в настоящем документе представлены способы, которые в некоторых вариантах осуществления включают введение во внутреннее ухо (например в улитку) субъекта (например животного, например млекопитающего, например примата, например человека) терапевтически эффективного количества любой композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов субъект был ранее идентифицирован, как имеющий дефективный ген-мишень клетки внутреннего уха (например ген-мишень поддерживающей и/или слуховой клетки, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности закодированного геном белка-мишени поддерживающей и/или слуховой клетки). Некоторые варианты осуществления любого из этих способов дополнительно включают определение до стадии введения или внедрения, что у субъекта имеется дефективный ген-мишень клетки внутреннего уха. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут дополнительно включать обнаружение мутации гена-мишени клетки внутреннего уха у субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из способов могут дополнительно включать идентификацию или диагностику субъекта, как имеющего несиндромальную или синдромальную нейросенсорную потерю слуха.

[0313] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены

способы исправления дефекта (например дефекта в GJB2) гена-мишени клетки внутреннего уха субъекта, например животного, например млекопитающего, например примата, например человека. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе, причем введение исправляет и или улучшает дефект гена-мишени клетки внутреннего уха в любой подгруппе клеток внутреннего уха субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью внутреннего уха может быть сенсорная клетка, например волосковая клетка, и/или несенсорная клетка, например поддерживающая клетка и/или все, или любая подгруппа клеток внутреннего уха.

[0314] Также в настоящем документе представлены способы увеличения уровня экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха в любой подгруппе клеток внутреннего уха субъекта (например животного, например млекопитающего, например примата, например человека), которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе, причем введение приводит к увеличению уровня экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха (например белка коннексина 26) в любой подгруппе клеток внутреннего уха субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью внутреннего уха может быть сенсорная клетка, например волосковая клетка, и/или несенсорная клетка, например поддерживающая клетка и/или все, или любая подгруппа клеток внутреннего уха.

[0315] Также в настоящем документе представлены способы лечения потери слуха, например несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха, у субъекта (например животного, например млекопитающего, например примата, например человека), у которого идентифицировано наличие дефективного гена-мишени клетки внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

[0316] Также в настоящем документе представлены способы восстановления синапсов и/или сохранения спиральных ганглиозных нервов у субъекта, у которого идентифицировано или диагностировано наличие нарушения внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

[0317] Также в настоящем документе представлены способы уменьшения размера и/или восстановления водопровода преддверия до подходящего размера. Также в настоящем документе представлены способы восстановления эндолимфатического рН до подходящего и/или приемлемого уровня у субъекта, у которого идентифицировано или диагностировано наличие нарушения внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

[0318] Также в настоящем документе представлены способы, которые включают

введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

[0319] Также в настоящем документе представлены хирургические способы лечения потери слуха (например несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха). В некоторых вариантах осуществления способы включают стадии: проведения в улитке субъекта первого разреза в точке первого разреза; и введение в улитку терапевтически эффективного количества любой из композиций, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в точке первого разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

[0320] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, любую композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту в овальную барабанную перепонку улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, любую из композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту во вторичную барабанную перепонку улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов во вторичной барабанной перепонке. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, имеющих, как правило, круглую первую форму, причем каждая микроигла имеет диаметр по меньшей мере примерно 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный содержать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, каждая из которых имеет полость, способную переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания по меньшей мере частичного разрежения.

[0321] В некоторых вариантах осуществления методы настоящего раскрытия используют для лечения субъектов с потерей слуха или с ее риском. Например, в некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется аутосомальная рецессивная потеря слуха, связанная по меньшей мере с одним патогенным вариантом GJB2. Специалистам в данной области должно быть понятно, что к патогенному варианту может приводить множество разных мутаций в GJB2. В некоторых таких вариантах осуществления патогенный вариант вызывает или несет риск потери слуха.

[0322] В некоторых вариантах осуществления субъекта, страдающего потерей слуха, оценивают, чтобы определить, имеется ли и где может иметься одна или более мутаций, которые могут вызывать потерю слуха. В некоторых таких вариантах осуществления оценивают статус продуктов или функции гена GJB2 (например с помощью анализа белка или секвенирования). В некоторых вариантах осуществления любого из способов,

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

[0323] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, способы приводят к улучшению слуха (например любого из показателей для определения улучшения слуха, описанных в настоящем документе) у нуждающегося в этом субъекта в течение по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 55 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 65 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 75 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 85 дней, по меньшей мере 100 дней, по меньшей мере 105 дней, по меньшей мере 110 дней, по меньшей мере 115 дней, по меньшей мере 120 дней, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.

[0324] В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) развивается или имеется риск развития синдромальной или несиндромальной нейросенсорной потери слуха. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) ранее было идентифицировано наличие мутации гена GJB2. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) имеется любая из мутаций гена GJB2, которые описаны в настоящем документе, или в данной области известно, что они связаны с синдромальной или несиндромальной нейросенсорной потерей слуха.

[0325] В некоторых вариантах осуществления было идентифицировано, что субъект (например животное, например млекопитающее, например человек) является носителем мутации гена GJB2 (например с помощью генетического тестирования). В некоторых

вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) идентифицировано наличие мутации гена GJB2 и диагностирована синдромальная или несиндромальная нейросенсорная потеря слуха. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) идентифицировано наличие синдромальной или несиндромальной нейросенсорной потери слуха.

[0326] В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например животного, например млекопитающего, например человека) идентифицирован риск потери слуха (например риск того, что он является носителем мутации гена, например мутации GJB2). В некоторых таких вариантах осуществления субъект (например животное, например млекопитающее, например человек) может иметь определенные факторы риска потери слуха или риск потери слуха (например известный родитель-носитель, больной брат или сестра или симптомы потери слуха). В некоторых таких вариантах осуществления было идентифицировано, что субъект (например животное, например млекопитающее, например человек) является носителем мутации гена GJB2 (например с помощью генетического тестирования), которая ранее не была идентифицирована (то есть не опубликованного или не известного иным образом варианта GJB2). В некоторых таких вариантах осуществления идентифицированные мутации могут быть новыми (то есть не описанными ранее в литературе), и способы лечения субъекта с заболеванием или предрасположенного к потере слуха будут персонализированы для мутации (мутаций) конкретного пациента.

[0327] В некоторых вариантах осуществления успешное лечение синдромальной или несиндромальной нейросенсорной потери слуха может быть определено у субъекта с использованием любого обычного функционального теста слуха, известного в данной области. Неограничивающие примеры функциональных тестов слуха включают различные типы аудиометрических анализов (например тестирование чистого тона, тестирование речи, тестирование среднего уха, слуховая реакция ствола мозга и отоакустическая эмиссия).

[0328] В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, две или более дозы любой композиции, описанной в настоящем документе, вводят в улитку субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение первой дозы композиции в улитку субъекта, тестирование слуховой функции субъекта, после введения первой дозы и после введения дополнительной дозы композиции в улитку субъекта, у которого обнаружено отсутствие слуховой функции в пределах нормального диапазона (например которую определяют с использованием любого теста для слуха, известного в данной области).

[0329] В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, композиция может быть составлен для введения в улитку. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить с помощью введения в улитку или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого

из способов, описанных в настоящем документе, композиции вводят за счет применения медицинского устройства (например любого из иллюстративных медицинских устройств, описанных в настоящем документе).

[0330] В некоторых вариантах осуществления внутрикохлеарное введение можно осуществлять с использованием любого из способов, описанных в настоящем документе или известных в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с помощью 0-градусного жесткого эндоскопа диаметром 2,5 мм очищают наружный слуховой проход и используют круглый нож, чтобы резко очертить тимпаномеатальный лоскут примерно 5 мм. Затем тимпаномеатальный лоскут приподнимают, и входят в среднее ухо сзади. Идентифицируют и пересекают нерв барабанной струны, и с помощью кюретки удаляют skutальную кость, обнажая вторичную барабанную перепонку. Для улучшения апикального распределения введенной композиции можно использовать хирургический лазер для создания небольшого 2-миллиметрового отверстия в барабанной перепонке, чтобы обеспечить перемещение перилимфы во время инфузии композиции через вторичную барабанную перепонку. Затем микроинфузионное устройство загружают и вводят в операционное поле. Устройство подводят к барабанной перепонке, а наконечник помещают в костный выступ барабанной перепонки, чтобы обеспечить проникновение микроиглы (микроигл) через перепонку. Приводят в действие педаль, чтобы обеспечить размеренное, устойчивое введение композиции. Затем устройство извлекают, а барабанную перепонку и опорную пластину стремени герметизируют пластырем из гелевой пены.

[0331] В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, у субъекта имеется синдромальная или несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или риск ее развития. В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, у субъекта было ранее идентифицировано наличие мутации гена-мишени клетки внутреннего уха, гена который может экспрессироваться в поддерживающих клетках и/или волосковых клетках.

[0332] В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, было идентифицировано, что субъект является носителем мутации гена-мишени клетки внутреннего уха (например с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, у субъекта было идентифицировано наличие мутации гена-мишени клетки внутреннего уха и диагностирована потеря слуха (например несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или синдромальная нейросенсорная потеря слуха, например DFNB1, DFNA3, синдром Барта-Памфри, иглистый ихтиоз с глухотой (HID), ладонно-подошвенная кератодермия с глухотой, синдром кератита-ихтиоза-глухоты (KID) или синдром Вохвинкеля, соответственно). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта была идентифицирована потеря слуха (например несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или синдромальная

нейросенсорная потеря слуха). В некоторых вариантах осуществления успешное лечение потери слуха (например несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха) может быть определено у субъекта с использованием любого из обычных функциональных тестов слуха, известных в данной области. Неограничивающие примеры функциональных тестов слуха включают различные типы аудиометрических анализов (например тестирование чистого тона, тестирование речи, тестирование среднего уха, слуховая реакция ствола мозга и отоакустическая эмиссия).

[0333] В некоторых вариантах осуществления рассматриваемая клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления указанную клетку изначально получают от субъекта и культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что рассматриваемая клетка имеет дефектный ген-мишень в клетке внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что рассматриваемая клетка имеет дефектный ген-мишень волосковой клетки. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что рассматриваемая клетка имеет дефектный ген-мишень поддерживающей клетки.

[0334] В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например одного или двух, или более введений композиций, описанных в настоящем документе, происходит увеличение экспрессии активного белка-мишени клетки внутреннего уха (например белка коннексина 26). В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного белок-мишень внутреннего уха, как описано в настоящем документе (например белок коннексин 26) сравнивают с контрольным уровнем, например сравнивают с уровнем экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха до введения композиций, содержащих любую конструкцию (конструкции), как описано в настоящем документе.

[0335] В данной области известны способы обнаружения экспрессии и/или активности белка-мишени (например белка коннексина 26). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха можно определять непосредственно (например определять белок-мишень клетки внутреннего уха или мРНК-мишень. Неограничивающие примеры методов, которые можно использовать для определения экспрессии и/или активности РНК или белка-мишени (например продукта гена GJB2 и/или белка коннексина 26 или его функциональной характеристической части), прямо включают: ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка-мишени клетки внутреннего уха можно определить косвенно (например через функциональные тесты слуха).

Устройства, Введение и Хирургические Способы

[0336] В настоящем документе представлены системы терапевтической доставки для лечения потери слуха (например несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха). В одном аспекте система терапевтической

доставки содержит: i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов во вторичной барабанной перепонке внутреннего уха нуждающегося в этом субъекта и ii) эффективную дозу композиции (например любую из композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

[0337] Также в настоящем документе представлены хирургические способы лечения потери слуха (например несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха). В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии: проведения в улитке субъекта первого разреза в точке первого разреза; и введение в улитку терапевтически эффективного количества любой из композиций, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в точке первого разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

[0338] В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, любую из композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту в овальную барабанную перепонку улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, любую из композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту во вторичную барабанную перепонку улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов во вторичной барабанной перепонке. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, имеющих, как правило, круглую первую форму, причем каждая микроигла имеет диаметр по меньшей мере примерно 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный содержать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, каждая из которых содержит полость, способную переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания по меньшей мере частичного разрежения.

[0339] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие описывает подход к доставке, в котором используют минимально инвазивный, хорошо принятый хирургический метод для доступа к среднему уху и/или внутреннему уху через наружный слуховой канал. метод включает открытие одного из физических барьеров между средним и внутренним ухом в овальном окне и последующее использование устройства, раскрытого в настоящем документе, например как показано на фиг. 8-11 (или микрокатетер), для доставки композиции, раскрытой в настоящем документе, с регулируемой скоростью потока и с фиксируемым объемом через вторичную барабанную перепонку.

[0340] В некоторых вариантах осуществления хирургические методы для

млекопитающих (например грызунов (например мышей, крыс, хомяков или кроликов), приматов (например NHP (например макак, шимпанзе, низших обезьян или высших обезьян) или человека) могут включать вентиляцию для увеличения скорости трансдукции вектора AAV по длине улитки. В некоторых вариантах осуществления отсутствие вентиляции во время операции может привести к более низкой скорости трансдукции клеток улитки вектора AAV по сравнению со скоростью трансдукции клеток улитки вектора AAV после операций, выполненных с вентиляцией. В некоторых вариантах осуществления вентиляция повышает скорость трансдукции ИНС примерно на 75-100% по всей улитке. В некоторых вариантах осуществления вентиляция обеспечивает скорость трансдукции ИНС примерно 50-70%, примерно 60-80%, примерно 70-90% или примерно 80-100% у основания улитки. В некоторых вариантах осуществления вентиляция обеспечивает скорость трансдукции ИНС примерно 50-70%, примерно 60-80%, примерно 70-90% или примерно 80-100% на верхушке улитки.

[0341] Устройство доставки, описанное в настоящем документе, может быть помещено в стерильное поле операционной, а конец трубки может быть удален из стерильного поля и соединен со шприцем, в который загружена композиция, раскрытая в настоящем документе (например один или более векторов AAV) и установлены в насос. После соответствующей подготовки системы для удаления воздуха можно провести иглу через среднее ухо под визуальным контролем (хирургический микроскоп, эндоскоп и/или камера на дистальном конце). Иглу (или микроиглу) можно использовать для прокола RWM. Иглу можно вводить до тех пор, пока стопор не коснется RWM. Затем устройство можно удерживать в этом положении, пока описанную в данном документе композицию доставляют с регулируемой скоростью потока во внутреннее ухо в течение выбранного периода времени. В некоторых вариантах осуществления скорость потока (или скорость инфузии) может включать скорость примерно 30 мкл/мин, или примерно от 25 мкл/мин до примерно 35 мкл/мин, или примерно от 20 мкл/мин до примерно 40 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 70 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 90 мкл/мин, или от примерно 20 мкл/мин до примерно 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления скорость потока составляет примерно 20 мкл/мин, примерно 30 мкл/мин, примерно 40 мкл/мин, примерно 50 мкл/мин, примерно 60 мкл/мин, примерно 70 мкл/мин, примерно 80 мкл/мин, примерно 90 мкл/мин или примерно 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления выбранная продолжительность времени (то есть время, в течение которого протекает композиция, раскрытая в данном документе) может составлять примерно 3 минуты, или примерно от 2,5 минут до примерно 3,5 минут, или примерно от 2 минут до примерно 4 минут, или от примерно 1,5 минут до примерно 4,5 минут, или от примерно 1 минуты до примерно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления общий объем раскрытой в настоящем документе композиции, которая поступает во внутреннее ухо, может составлять примерно 0,09 мл, или от примерно 0,08 мл до примерно 0,10 мл, или от примерно 0,07 мл до примерно 0,11 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем раскрытой в данном документе композиции составляет от примерно 40% до

примерно 50% объема внутреннего уха.

[0342] После завершения доставки устройство может быть удалено. В некоторых вариантах осуществления устройство, описанное в настоящем документе, может быть сконфигурировано как одноразовое изделие. В других вариантах осуществления устройство, описанное в настоящем документе, может быть сконфигурировано как многоразовое стерилизуемое изделие, например, со сменным и/или стерилизуемым узлом иглы. После завершения введения одноразовые устройства можно надлежащим образом утилизировать (например в контейнер для биологически опасных острых предметов).

[0343] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, содержит одну или несколько конструкций гAAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции гAAV, все конструкции гAAV отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV содержит область, кодирующую ингибитор VEGF, например, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит частицу гAAV, содержащую конструкцию AAV, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 44.

[0344] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, может быть введена субъекту с помощью хирургической процедуры. В некоторых вариантах осуществления введение, например, с помощью хирургической процедуры, включает инъекцию композиции, описанной в настоящем документе, с помощью устройства для доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо. В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; и инъекцию композиции, раскрытой в настоящем документе, через устройство доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо.

[0345] В некоторых вариантах осуществления хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; инъекцию композиции, раскрытой в настоящем документе, через устройство доставки, как описано в настоящем документе, во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг круглого окна и/или овального окна субъекта; опускание тимпаномеатального лоскута субъекта в анатомическое положение.

[0346] В некоторых вариантах осуществления хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; подготовку круглого окна субъекта; выполнение микростапедотомии с помощью лазера; подготовку как устройства для доставки, как описано в настоящем документе, так и композиции, раскрытой в настоящем документе, для доставки во внутреннее ухо; инъекцию раскрытой в настоящем документе композиции через устройство доставки во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг

круглого окна и/или овального окна субъекта; опускание тимпаномеатального лоскута обследуемого в анатомическое положение.

[0347] В некоторых вариантах осуществления микростапедотомия с помощью лазера включает использование отологического лазера КТР и/или отологического лазера CO₂.

[0348] В качестве другого примера композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят с использованием устройства и/или системы, специально разработанной для внутрикохлеарного пути введения. В некоторых вариантах осуществления элементы конструкции описанного в настоящем документе устройства могут обеспечивать: поддержание стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; способность точно доставлять небольшие объемы с контролируемой скоростью; доставку через наружный слуховой проход хирургом; минимизацию повреждения вторичной барабанной перепонки (RWM) или внутреннего уха, например, структур улитки за пределами RWM; и/или сведение к минимуму обратного просачивания закачиваемой жидкости через RWM.

[0349] Устройства, системы и способы, представленные в настоящем документе, также описывают потенциальную возможность безопасной и эффективной доставки композиции во внутреннее ухо для лечения состояний и расстройств, при которых будет полезна доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, во внутреннее ухо, включая без ограничения нарушения слуха, например, как описано в настоящем документе. В качестве другого примера, за счет создания отверстия в опорной пластине стремени и введения через RWM раскрытая в настоящем документе композиция распределяется по всей улитке с минимальным разбавлением в месте воздействия. Разработка описываемых устройств позволяет проводить процедуру хирургического введения через наружный слуховой проход человека. Описанные устройства можно удалить из уха после введения некоторого количества жидкости в перилимфу улитки. У субъектов устройство можно продвигать через наружный слуховой проход либо под хирургическим микроскопическим управлением, либо вместе с эндоскопом.

[0350] Иллюстративное устройство для использования в любом из раскрытых в настоящем документе способов описано на фиг.8-11. На фиг.8 показано иллюстративное устройство 10 для доставки текучей среды во внутреннее ухо. Устройство 10 содержит рифленую ручку 12 и липкий материал 14 для дистальной ручки (например, эпоксидный состав, такой как Loctite 4014), соединенный с телескопической опорой 24 иглы гипотрубки. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может иметь рифленые элементы или канавки для улучшения захвата. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может иметь толщину от примерно 5 мм до примерно 15 мм или от примерно 5 мм до примерно 12 мм, или от примерно 6 мм до примерно 10 мм, или от примерно 6 мм до примерно 9 мм, или от примерно 7 мм до примерно 8 мм. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может быть полой, чтобы жидкость могла проходить через устройство 10 во время использования. Устройство 10 может также содержать липкий материал 16 проксимальной ручки на проксимальном

конце 18 рифленой ручки 12, узел 26 иглы (показано на фиг. 9) со стопором 28 (показан на фиг. 34) на дистальном конце 20 устройства 10 и элемент 22 для ослабления натяжения. Элемент 22 для ослабления натяжения может состоять из материала Santoprene, материала Pebax, полиуретанового материала, силиконового материала, нейлонового материала и/или термопластичного эластомера. Телескопическая опора 24 иглы гипотрубки окружает и поддерживает изогнутую иглу 38 (показанную на фиг.9), расположенную внутри нее.

[0351] Ссылаясь на фиг. 8, стопор 28 может состоять из термопластичного материала или пластикового полимера (такого как полимер, отверждаемый УФ-излучением), а также других подходящих материалов и может использоваться для предотвращения слишком глубокого введения изогнутой иглы 38 в слуховой проход (например для предотвращения введения изогнутой иглы 38 в боковую стенку или другую структуру внутреннего уха). Устройство 10 также может содержать коническую часть 23, расположенную между рифленой ручкой 12 и липким материалом 14 дистальной ручки, который соединен с телескопической опорой 24 иглы гипотрубки. Рифленая ручка 12 (или часть ручки) может содержать коническую часть 23 на дистальном конце ручки 12. Устройство 10 может также содержать трубку 36, соединенную с возможностью прохождения текучей среды с проксимальным концом 16 устройства 10, и действует как линия впуска текучей среды, соединяющая устройство с расположенными перед ним компонентами (например насосом, шприцем и/или расположенными перед ним компонентами, которые в некоторых вариантах осуществления могут быть соединены с системой управления и/или источником питания (не показаны)). В некоторых вариантах осуществления изогнутая игла 38 (показана на фиг. 9) проходит от дистального конца 20 через телескопическую опору 24 иглы гипотрубки, через коническую часть 23, через рифленую ручку 12 и через элемент 22 для ослабления натяжения и соединена с возможностью прохождения текучей среды непосредственно с трубкой 36. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 соединена с возможностью прохождения текучей среды с полый внутренней частью рифленой ручки (например через телескопическую опору 24 иглы гипотрубки), которая, в свою очередь, соединена с возможностью прохождения текучей среды на проксимальном конце 16 с трубкой 36. В вариантах осуществления, где изогнутая игла 38 не проходит полностью через внутреннюю часть устройства 10, площадь контакта (например между перекрывающимися вложенными друг в друга гипотрубками 42), допуски и/или герметики между взаимодействующими компонентами должны быть достаточными. для предотвращения утечки терапевтической текучей среды из устройства 10 (которое работает при относительно низком давлении (например от примерно 1 Па до примерно 50 Па, или от примерно 2 Па до примерно 20 Па, или от примерно от 3 Па до примерно 10 Па)).

[0352] На фиг. 9 показан вид сбоку узла 26 изогнутой иглы в соответствии с аспектами вариантов осуществления настоящего раскрытия. Узел 26 изогнутой иглы содержит иглу 38, имеющую изогнутую часть 32. Узел 26 изогнутой иглы может также содержать стопор 28, соединенный с изогнутой частью 32. Изогнутая часть 32 содержит угловой наконечник 34 на дистальном конце 20 устройства 10 для прокалывания ушной

перепонки (например RWM). Игла 38, изогнутая часть 32 и угловой наконечник 34 являются полыми, так что через них может протекать текучая среда. Угол 46 (как показано на фиг. 11) изогнутой части 32 может варьироваться. Геометрия стопора 28 может быть цилиндрической, дисковой, кольцеобразной, куполообразной и/или другой подходящей формы. Стопор 28 может быть отформован на месте на изогнутой части 32. Например, стопор 28 можно расположить концентрически вокруг изогнутой части 32 с использованием липкого материала или компрессионного фитинга. Примеры клеев включают клей, отверждаемый УФ-излучением (такой как Dymax 203A-CTH-F-T), эластомерные клеи, термореактивные клеи (такие как эпоксидные или полиуретановые) или эмульсионные клеи (такие как поливинилацетат). Стопор 28 устанавливают концентрически вокруг изогнутой части 32 так, чтобы вставлять угловой наконечник 34 в ухо на нужную глубину введения. Изогнутая игла 38 может быть сформирована из прямой иглы с использованием пошагового формования, а также других подходящих методов.

[0353] Фиг. 10 иллюстрирует вид в перспективе иллюстративного устройства 10 для доставки текучей среды во внутреннее ухо. Трубка 36 может иметь длину от примерно 1300 мм (размер 11 на фиг. 10) до примерно 1600 мм, или от примерно 1400 мм до примерно 1500 мм, или от примерно 1430 мм до примерно 1450 мм. Элемент 22 для ослабления натяжения может иметь длину от примерно 25 мм до примерно 30 мм (размер 15 на фиг. 10) или от примерно 20 мм до примерно 35 мм. Ручка 12 может иметь длину примерно 155,4 мм (размер 13 на фиг. 10), или от примерно 150 до примерно 160 мм, или от примерно 140 до примерно 170 мм. Телескопическая опора 24 иглы гипотрубки может иметь две или более вложенных гипотрубок, например три вложенных гипотрубки 42А, 42В и 42С, или четыре вложенных гипотрубки 42А, 42В, 42С и 42D. Общая длина гипотрубок 42А, 42В, 42С и узла 26 наконечника (размер 17 на фиг. 10) может составлять от примерно 25 мм до примерно 45 мм, или от примерно 30 мм до примерно 40 мм, или примерно 35 мм. Кроме того, телескопическая опора 24 иглы гипотрубки может иметь длину примерно 36 мм, или примерно от 25 мм до примерно 45 мм, или от примерно 30 мм до примерно 40 мм. Каждая из трех вложенных гипотрубок 42А, 42В и 42С может иметь длину 3,5 мм, 8,0 мм и 19,8 мм, соответственно, плюс или минус примерно 20%. Самая внутренняя вложенная гипотрубка (или самая узкая часть) телескопической опоры 24 иглы гипотрубки может быть расположена концентрически вокруг иглы 38.

[0354] На фиг. 11 показан вид в перспективе узла 26 изогнутой иглы, соединенного с дистальным концом 20 устройства 10, в соответствии с аспектами вариантов осуществления настоящего раскрытия. Как показано на фиг. 11, узел 26 изогнутой иглы может содержать иглу 38, соединенную с изогнутой частью 32. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 может быть единой иглой (например прямой иглой, которая затем изгибается таким образом, чтобы иметь нужный угол 46). Игла 38 может быть иглой калибра 33 или может иметь калибр от примерно 32 до примерно 34 или от примерно 31 до 35. При более тонком калибре необходимо следить за тем, чтобы трубка 36 не перегибалась и не повреждалась. Игла 38 может быть присоединена к ручке 12 для

безопасного и точного введения иглы 38 во внутреннее ухо. Как показано на фиг. 11, узел 26 изогнутой иглы может также содержать стопор 28, расположенный вокруг изогнутой части 32. На фиг. 11 также показано, что изогнутая часть 32 может содержать угловой наконечник 34 для прокалывания мембраны уха (например RWM). Стопор 28 может иметь высоту 48 примерно 0,5 мм, или от примерно 0,4 мм до примерно 0,6 мм, или от примерно 0,3 мм до примерно 0,7 мм. Изогнутая часть 32 может иметь длину 52 примерно 1,45 мм, или примерно от 1,35 мм до примерно 1,55 мм, или примерно от 1,2 мм до примерно 1,7 мм. В других вариантах осуществления изогнутая часть 32 может иметь длину более 2,0 мм, так что расстояние между дистальным концом стопора 28 и дистальным концом изогнутого наконечника 34 составляет от примерно 0,5 мм до примерно 1,7 мм или примерно от 0,6 мм до примерно 1,5 мм, или от примерно 0,7 мм до примерно 1,3 мм, или от примерно 0,8 мм до примерно 1,2 мм. На фиг.11 показано, что стопор 28 может иметь цилиндрическую, дискообразную и/или куполообразную геометрию. Рядовому специалисту будет понятно, что можно использовать и другие геометрические формы.

Оценка потери слуха и восстановления

[0355] В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с использованием измерений слухового вызванного потенциала ствола головного мозга (ABR). В некоторых вариантах осуществления слух проверяют путем измерения отоакустической эмиссии продукта искажения (DPOAE). В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи сравниваются с предыдущими записями для того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений реакции, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления у субъекта регистрируют измерения ABR и/или DPOAE до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение согласно одному или нескольким методам, описанным в настоящем документе, будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE после лечения по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы последующего наблюдения после лечения.

[0356] В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью распознавания образов речи или определяет логопед. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют путем тестирования чистого тона. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тестирования костной проводимости. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тестирования акустического рефлекса. В некоторых воплощениях функцию слуха определяют с помощью тимпанометрии. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью любой комбинации анализа слуха, известной в данной области. В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят

комплексно и/или на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи и/или профессиональный анализ сравнивают с предыдущими записями и/или анализом для того же субъекта и/или известными пороговыми значениями таких измерений реакции, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слуха, которые должны быть определены как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проводят распознавание речевых образов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения и/или анализ тимпанометрии до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение с помощью одной или нескольких технологий, описанных в настоящем документе, будет иметь улучшения в распознавании речевых образов, тестировании чистого тона, тестировании костной проводимости, тестировании акустического рефлекса и/или измерениях тимпанометрии после лечения по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах осуществления распознавание речевых образов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения тимпанометрии проводят после проведения лечения и через регулярные промежутки времени после лечения.

Методы получения характеристики

[0357] Термин «мутация в гене GJB2» относится к модификации известного консенсусного функционального гена GJB2, которая приводит к выработке белка коннексина 26, имеющего одно или несколько из: одной или нескольких аминокислотных делеций, одной или нескольких аминокислотных замен и одной или нескольких аминокислотных вставок по сравнению с консенсусным функциональным белком коннексином 26 и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка коннексина 26 в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка коннексина 26 в клетке млекопитающего, не имеющей мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к выработке белка коннексина 26, имеющего делецию в одной или нескольких аминокислотах (например в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотах). В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к сдвигу рамки считывания в гене GJB2. Известно, что термин «сдвиг рамки» охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления сдвиг рамки считывания может привести к нефункциональному белку. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация может быть нонсенс-мутацией (то есть приводит к преждевременному терминирующему кодону в экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к выработке укороченного белка (по сравнению с соответствующим консенсусным функциональным белком), который может быть функциональным, а может и не быть. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК GJB2 или белка коннексина 26 или как мРНК, так и белка. В некоторых вариантах осуществления

мутация может приводить к выработке измененного белка коннексина 26, имеющего потерю или снижение одной или нескольких биологических активностей (функций) по сравнению с консенсусным функциональным белком коннексином 26.

[0358] В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одного или нескольких нуклеотидов в ген GJB2. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной и/или управляющей последовательности гена коннексина 26, то есть в части гена, которая не является кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления мутация в регуляторной и/или управляющей последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена GJB2. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в известном гетерологичном гене, о котором известно, что он взаимодействует с белком коннексином 26, или в гене GJB2 (например, GJB6 или других генах щелевых контактов).

[0359] Способы генотипирования и/или обнаружения экспрессии или активности мРНК GJB2 и/или белка коннексина 26 известны в данной области (см., например, Ito et al., *World J Otorhinolaryngol.* 2013 May 28; 3(2): 26). -34, и Roesch et al., *Int J Mol Sci.*, 2018, январь, 19(1): 209, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК GJB2 или белка коннексина 26 можно определять напрямую (например, определяя белок коннексин 26, определяя мРНК GJB2 и так далее). Неограничивающие примеры методов, которые можно использовать для непосредственного обнаружения экспрессии и/или активности GJB2, включают, например, ПЦР в реальном времени, количественную ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка GJB2 и/или коннексина 26 может быть обнаружена косвенно (например, с помощью тестов функционального слуха, ABR, DPOAE и так далее).

[0360] В некоторых вариантах осуществления образцы ткани (например, содержащие одну или несколько клеток внутреннего уха, например, содержащие одну или несколько волосковых клеток и/или одну или несколько поддерживающих клеток) можно оценивать с помощью морфологического анализа для определения морфологии волосковых клеток и /или поддерживающих клеток до и после введения любых средств (например композиций, например, композиций, содержащих конструкции и/или частицы и так далее), как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используют *in vitro* или *ex vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько анализов одного или нескольких белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или нескольких образцах субъекта или клеточных популяциях *in vitro*.

Способы получения

[0361] Системы AAV, как правило, хорошо известны в данной области (см., например, Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-17 (1994); Cotten et al., *P.N.A.S. U.S.A.*, 89(13):6094-98 (1992); Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129 (1992); и Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4):699-708 (2012), каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Способы создания и использования конструкций AAV описаны, например, в патентах США №№ 5139941, 4797368 и в поданной заявке PCT US2019/060328, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0362] Способы получения вирусных конструкций известны в данной области. Например, для получения конструкций AAV способы обычно включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV или его фрагмент; функциональный ген гер; конструкцию рекомбинантного AAV, состоящую из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и кодирующей последовательности; и/или достаточные хелперные функциональные элементы, позволяющие упаковывать конструкцию рекомбинантного AAV в капсидные белки AAV.

[0363] В некоторых вариантах осуществления компоненты для культивирования в клетке-хозяине для упаковки конструкции AAV в капсиде AAV могут быть предоставлены в клетке-хозяине в транс положении. В качестве альтернативы, любой один или несколько компонентов (например, конструкция рекомбинантного AAV, последовательности повторов, последовательности сар и/или хелперные функциональные элементы) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована таким образом, чтобы содержать один или несколько таких компонентов с использованием способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления такая стабильная клетка-хозяин содержит такой компонент (компоненты) под управлением индуцируемого промотора. В некоторых вариантах осуществления такой компонент (компоненты) может находиться под управлением конститутивного промотора. В некоторых вариантах осуществления выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный компонент (компоненты) под управлением конститутивного промотора и другой выбранный компонент (компоненты) под управлением одного или нескольких индуцируемых промоторов. Например, стабильная клетка-хозяин может быть получена, то есть происходит из клеток НЕК293 (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под управлением конститутивного промотора), но которые содержат белки гер и/или сар под управлением индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть получены специалистом в данной области с использованием обычных способов.

[0364] Конструкция рекомбинантного AAV, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функциональные элементы, необходимые для получения AAV согласно настоящему изобретению, могут быть доставлены в

упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (например, конструкции). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, известным в данной области, например, специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами, включая генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N.Y., который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Точно так же хорошо известны способы получения частиц AAV, и любой подходящий способ можно использовать с настоящим изобретением (см., например, K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) и патент США № 5478745, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

[0365] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с использованием метода тройной трансфекции (например, как описано в патенте США № 6001650, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантной конструкцией AAV (содержащей кодирующую последовательность) для упаковки в частицы AAV, конструкцию хелперного функционального элемента AAV и конструкцию вспомогательного функционального элемента. Конструкция хелперного функционального элемента AAV кодирует последовательности «хелперного функционального элемента AAV» (то есть гер и сар), которые функционируют в транс положении для продуктивной репликации и инкапсуляции AAV. В некоторых вариантах осуществления хелперная функциональная конструкция AAV поддерживает эффективную выработку конструкции AAV без образования каких-либо обнаруживаемых частиц AAV дикого типа (то есть частиц AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры конструкций, подходящих для использования в соответствии с настоящим изобретением, включают pHLP19 (см., например, патент США № 6001650, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки) и конструкцию pRepбсарб (см., например, патент США № 6156303, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Конструкция хелперного функционального элемента кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функциональных элементов, происходящих не от AAV, от которых зависит репликация AAV (то есть «дополнительные функциональные элементы»). Дополнительные функциональные элементы могут включать те функциональные элементы, которые необходимы для репликации AAV, включая без ограничения те фрагменты, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, сплайсинге мРНК AAV, специфичном для стадии, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии сар и сборке капсида AAV. Вирусные дополнительные функциональные элементы могут быть получены из любых известных вирусов-помощников, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

[0366] Дополнительные способы получения и выделения вирусных конструкций

AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № №7790449; патенте США. № 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США. № 7588772, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В одной системе клеточную линию продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией (конструкциями), которая кодирует гер и сар. В другой системе упаковывающую клеточную линию, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, кодирующей кодирующую последовательность, фланкированную ITR. В каждой из этих систем частицы AAV продуцируются в ответ на заражение хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, и AAV отделяют от контаминирующего вируса. Другие системы не требуют заражения хелперным вирусом для восстановления AAV - хелперные функциональные элементы (например аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29 и полимеразы вируса герпеса) также предоставляются системой в транс положении. В таких системах хелперные функциональные элементы можно обеспечивать с помощью временной трансфекции клеток конструкциями, кодирующими хелперные функциональные элементы, или клетки могут быть сконструированы так, чтобы стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функциональные элементы, экспрессией которых можно управлять на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

[0367] В некоторых вариантах осуществления определяют титры вирусных конструкций после очистки. В некоторых вариантах осуществления титры определяют с помощью количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления для определения уровней конструкции используют зонд TaqMan, специфичный для конструкции. В некоторых вариантах осуществления зонд TaqMan приведен, например, в SEQ ID NO: 58, в то время как прямой и обратный амплифицирующие праймеры приведены, например, в SEQ ID NO: 59 и 60, соответственно.

Иллюстративный зонд Taqman для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 58)

/56-FAM/TCTGGCTCA/ZEN/CCGTCCTCTTCATTT/3IABkFQ/

Иллюстративный прямой праймер для количественной ПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 59)

CAAACACTCCACCAGCATTTG

Иллюстративный обратный праймер для количественной ПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 60)

CAGCCACAACGAGGATCATA

[0368] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция согласно настоящему изобретению представляет собой конструкцию аденоассоциированного вируса (AAV). Было охарактеризовано несколько серотипов AAV, включая AAV1, AAV2, AAV3 (например, AAV3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV Anc80, а также их варианты. В некоторых вариантах

осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV2/6, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/Anc80 (например с капсидом AAV6, AAV8, AAV9 или Anc80 и конструкцией с ITR AAV2). Другие частицы и конструкции AAV описаны, например, в Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, для доставки кодирующей последовательности, описанной в настоящем документе, можно использовать любой серотип AAV. Однако серотипы имеют разные тропизмы, например, преимущественно поражают разные ткани. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV представляет собой самокомплементарную конструкцию AAV.

[0369] В настоящем раскрытии представлены, среди прочего, способы получения конструкций на основе AAV. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают использование клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может быть использована в качестве реципиента хелперной конструкции AAV, минигенной плазмиды AAV, конструкции вспомогательного функционального элемента и/или другой транспортной ДНК, связанной с выработкой рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, в рамках настоящего изобретения «клетка-хозяин» может относиться к клетке, которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии, геномному или полному набору ДНК, что и исходный родитель, из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации.

[0370] Дополнительные способы получения и выделения частиц AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7790449; патенте США № 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7588772, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В одной системе клеточную линию продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией (конструкциями), которая кодирует гер и сар. В другой системе упаковывающую клеточную линию, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, кодирующей кодирующую последовательность, фланкированную ITR. В каждой из этих систем частицы AAV продуцируются в ответ на заражение хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, и частицы AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы не требуют заражения хелперным вирусом для восстановления частиц AAV - хелперные функциональные элементы (например аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29 и полимеразы вируса герпеса) также поставляются системой в транс положении. В таких системах хелперные функциональные элементы можно обеспечивать путем временной трансфекции клеток конструкциями, кодирующими хелперные функциональные элементы, или клетки могут быть сконструированы так, чтобы стабильно содержать гены, кодирующие хелперные

функциональные элементы, экспрессией которых можно управлять на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

[0371] В еще одной системе кодирующую последовательность, фланкированную ITR и генами гер/сар, вводят в клетки насекомого-хозяина при заражении конструкциями на основе бакуловирусов. Такие системы выработки известны в данной области (см. в целом, например, Zhang et al., 2009, Human Gene Therapy 20:922-929, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Способы получения и использования этих и других систем выработки AAV также описаны в патентах США №№ 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823; и 7439065, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

[0372] Далее раскрытие подробно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, раскрытие никоим образом не следует рассматривать в качестве ограничения следующими примерами, а скорее следует рассматривать как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате представленных в настоящем документе идей.

[0373] Есть основание полагать, что специалист в данной области может, используя предыдущее описание и следующие примеры, а также то, что известно в данной области, создавать и использовать технологии настоящего раскрытия.

Пример 1: Конструирование вирусных конструкций

[0374] В этом примере представлено описание создания вирусной конструкции, как описано в настоящем документе. Частицу рекомбинантного AAV (rAAV) получали путем трансфекции методом без аденовирусов, который использовали Xiao et al., J Virol. 73(5):3994-4003, 1999, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Цис-плазмиды с ITR AAV, транс-плазмиду с генами Rep и Cap AAV и хелперную плазмиду с основной областью из генома аденовируса котрансфицировали в клетки HEK293. Конструкция rAAV экспрессировала коннексин 26 человека в соответствии со стратегией единственной конструкции с использованием описанных конструкций. Капсид AAV Anc80 получали для инкапсуляции уникальной конструкции, кодирующей белок коннексин 26 rAAV.

[0375] Специалисты в данной области легко поймут, что подобные конструкции могут быть получены в соответствии с этим примером. Например, могут быть созданы конструкции rAAV, которые экспрессируют коннексин 26 млекопитающих, приматов или человека в стратегиях с одной, двумя или несколькими конструкциями. Каждый AAV серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 может быть приготовлен для инкапсулирования четырех наборов конструкций коннексина 26 для тестирования (i) стратегии конкатемеризации-транспликации, (ii) стратегии гибридной интронно-

гомологичной рекомбинации-транспликации, (iii) стратегии экзонной гомологичной рекомбинации, как описано в Pryadkina et al., *Meth. Clin. Devel.* 2:15009, 2015, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки, и (iv) стратегию единой конструкции. В некоторых вариантах осуществления частицу рекомбинантного AAV (rAAV) получают путем трансфекции методом без аденовирусов, который использован в Xiao et al., *J Virol.* 73(5):3994-4003, 1999, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 2: Получение и очистка вирусных частиц

[0376] В этом примере представлено описание очистки вирусной конструкции. Рекомбинантный AAV (rAAV) получают с использованием протокола тройной трансфекции и очищают. Фракции анализируют с помощью дот-блоттинга для определения фракций, которые содержат геномы rAAV. Количество геномов вирусов (гв) каждого препарата определяют методом количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома конструкции AAV (Bartoli et al., *Gene. Ther.* 13:20-28, 2006, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки).

[0377] В некоторых вариантах осуществления этого примера рекомбинантный AAV (rAAV) получали с использованием стандартного протокола тройной трансфекции и очищали двумя последовательными градиентами плотности хлорида цезия (CsCl), как описано в Pryadkina et al., *Mol. Ther.* 2:15009, 2015, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В конце второго центрифугирования 11 фракций по 500 мкл извлекали из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищали путем диализа в 1x PBS. Фракции анализировали методом дот-блоттинга для определения фракций, которые содержат геномы rAAV. Количество геномов вирусов (гв) каждого препарата определяли методом количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома конструкции AAV (Bartoli et al., *Gene. Ther.* 13:20-28, 2006, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки).

[0378] Специалисты в данной области легко поймут, что в соответствии с этим примером можно проводить аналогичные процессы получения и очистки. Например, частицы rAAV могут быть очищены с использованием различных методов колоночной хроматографии, известных в данной области, и/или вирусные геномы могут быть количественно определены с использованием альтернативных наборов праймеров.

Пример 3: Готовая форма вирусных частиц

[0379] Этот пример относится к приготовлению композиций, содержащих частицы rAAV и физиологически приемлемый раствор. Частицу rAAV получали и очищали до титра $1,2 \times 10^{13}$ гв/мл, а затем готовили в разведениях 6×10^4 , $1,3 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $4,5 \times 10^9$ и $1,3 \times 10^{10}$ гв/мл в физиологически приемлемом растворе (например коммерчески доступном 1xPBS с плюроновой кислотой F68, приготовленном с конечной концентрацией: 8,10 mM двухосновного фосфата натрия, 1,5 mM монофосфата калия, 2,7 mM хлорида калия, 172 mM

хлорида натрия и 0,001% плюроновой кислоты F68).

[0380] В альтернативных вариантах осуществления гAAV получают и очищают до известной концентрации (например до титра приблизительно 1×10^{13} гв/мл), а затем готовят в нужных концентрациях (например с разведением до 6×10^4 , $1,3 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $4,5 \times 10^9$ и $1,3 \times 10^{10}$ гв/мл) в физиологически приемлемом буфере (например коммерчески доступном 1хPBS с плюроновой кислотой F68, приготовленном до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия, 1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорид натрия и 0,001% плюроновой кислоты F68 или, например, в искусственной перилимфе, содержащей NaCl, 120 мМ, KCl, 3,5 мМ, CaCl₂, 1,5 мМ, глюкозу, 5,5 мМ, HEPES, 20 мМ, которую титруют NaOH для корректировки ее pH до 7,5 (общая концентрация Na⁺ 130 мМ), как описано в Chen et al., J Controlled Rel. 110:1-19, 2005, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Специалисты в данной области легко поймут, что в соответствии с этим примером можно приготовить альтернативные составы. Например, частицы гAAV могут быть очищены до альтернативного титра, приготовлены в альтернативных разведениях и суспендированы в альтернативных подходящих растворах.

Пример 4: Описание устройства

[0381] Этот пример относится к устройству, подходящему для доставки частиц гAAV во внутреннее ухо. Композицию, содержащую частицы гAAV, доставляют в улитку субъекта с помощью специального микрокатетера, предназначенного для последовательного и безопасного проникновения через вторичную барабанную перепонку (RWM). Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий процедуру доставки, может войти в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM. Дистальный конец микрокатетера может содержать по меньшей мере одну микроиглу диаметром от примерно 10 микрон до примерно 1000 микрон, которая создает перфорации в RWM, достаточные для того, чтобы обеспечить попадание описанной конструкции (например конструкции гAAV), в кохлеарную перилимфу барабанной лестницы со скоростью, которая не повреждает внутреннее ухо (например с физиологически приемлемой скоростью, например, со скоростью от приблизительно 30 мкл/мин до приблизительно 90 мкл/мин), но достаточно мала для заживления без хирургического вмешательства. В оставшуюся часть микрокатетера, проксимальную к микроигле (микроиглам), загружают состав гAAV/искусственной перилимфы с определенным титром (например приблизительно от 1×10^{12} до 5×10^{13} гв/мл). Проксимальный конец микрокатетера соединен с микроманипулятором, который позволяет осуществлять точные инфузии небольшого объема от приблизительно 30 мкл до приблизительно 100 мкл.

Пример 5: Демонстрация получения *in vitro* мРНК GJB2 и белка коннексина 26 (антитело против коннексина 26).

[0382] Этот пример относится к введению, регуляции и анализу экспрессии конструкций гAAV, экспрессирующих ген hGJB2, в клетках млекопитающих, выращенных

in vitro или *ex vivo*. Имитационные частицы гAAV, конструкции гAAV или частицы гAAV, содержащие конструкции гAAV (как представлено панелями (A)-(L) на фиг. 2), инкапсулированные капсидами Anc80, получали и либо трансдуцировали, либо трансфицировали в клеточную культуру с использованием известной клеточной концентрации и известной множественности заражения (MOI) (например клетки HEK293FT, высеванные с плотностью $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку при MOI $8,0 \times 10^4$, $1,5 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$ или 3×10^5 гв/кл на лунку в 24-луночном формате) или известной концентрации ДНК (примечание, данные показаны для выбранных конструкций при выбранных титрах). Клетки собирали через 48 часов после трансфекции или через 72 часа после трансдукции с использованием 100 мкл буфера RIPA (Thermo Scientific) на лунку или 350 мкл буфера для лизиса РНК RLT Plus (Qiagen). Для анализа экспрессии белка тридцать микролитров образцов загружали в отдельные лунки в 4-12% белковом геле Bis-Tris и проводили стандартные процедуры вестерн-блоттинга, известные в данной области. Характер полос определяли с использованием флуоресцентного ридера с тестом на антитела против коннексина 26 (Thermo Scientific) и винкулином или GAPDH в качестве контроля. Определяли структуру полос трансгенного белка коннексина 26 (фиг. 3, панель (A), фиг. 3, панель (B) и фиг. 3, панель (C)). На фиг. 3 панель (C) показаны полосы для белка, выделенного из клеток HEK293FT, которые были трансдуцированы при MOI 3×10^5 гв/клетку на лунку с имитацией частиц гAAV, AAVAnc80-CAG.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (фиг. 2, панель (F), SEQ ID NO: 82), AAVAnc80-smCBA.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (фиг. 2, панель (G), SEQ ID NO: 83), AAVAnc80-CMVhGJB2p.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (фиг. 2, панель (H), SEQ ID NO: 84) или AAVAnc80-CAG.hGJB2.FLAG (фиг. 2, панель (A), SEQ ID NO: 45) в качестве положительного контроля. Как показано на фиг. 3 панель (C), устойчивый сигнал hGJB2 был обнаружен с использованием промотора CAG, а также промотора small-CBA. Более слабая, но отчетливая полоса была также обнаружена после экспрессии hGJB2 после специальной комбинации CMV-энхансер/GJB2-промотор.

[0383] Для анализа экспрессии РНК, РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). Относительные уровни экспрессии мРНК определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами hGJB2 и зондом TaqMan (SEQ ID NO: 58-60) и зондом TaqMan GAPDH человека в качестве контроля (Life Technologies). Наблюдалась устойчивая и дозозависимая выработка мРНК GJB2 (фиг. 4).

[0384] Кроме того, были проведены эксперименты для определения уровней экспрессии мРНК из конструкций гAAV, трансдуцированных в эксплантаты дикого типа (*ex vivo*). Были получены имитационные частицы гAAV или частицы гAAV, содержащие конструкции гAAV (как представлено в панелях (A)-(E) на фиг. 2; данные показаны для выбранных конструкций в выбранных титрах), инкапсулированные капсидами Anc80, и трансдуцированы в эксплантаты при MOI $1,2 \times 10^{10}$ или $3,6 \times 10^{10}$ гв/улитка. Клетки собирали через 72 часа после трансдукции с использованием 350 мкл буфера для лизиса РНК RLT Plus (Qiagen) и готовили образцы РНК с использованием набора RNeasy Micro Kit (Qiagen). Относительные уровни экспрессии мРНК определяли с помощью количественной ПЦР в

реальном времени со специфическими праймерами hGJB2 и зондом TaqMan (SEQ ID NO: 58-60) и зондом TaqMan GAPDH человека в качестве контроля (Life Technologies). Наблюдалась устойчивая и дозозависимая выработка мРНК GJB2 (фиг. 4).

[0385] Кроме того, были проведены эксперименты для демонстрации регуляции экспрессии мРНК из конструкций gAAV, трансфицированных в клетки HEK293FT. Конструкции gAAV, содержащие hGJB2.FLAG (CAG.5UTR.hGJB2.FLAG.3UTR; SEQ ID NO: 82) и необязательные регуляторные сайты-мишени микроРНК (miRTS), расположенные в 3'UTR (CAG.5UTR.hGJB2.FLAG.miRTS.3UTR). ; фиг. 2M; SEQ ID NO: 87) трансфицировали в клетки HEK293FT по 300 нг с (+) или без (-) дополнительной плазмиды, содержащей области, кодирующие микроРНК (например miR-182 и miR-183), трансфицированные по 400 нг. Через 72 ч после трансфекции клетки собирали для анализа белка GJB2 и РНК с использованием вестерн-блоттинга (см. панель (A) на фиг. 7) и количественной ПЦР в реальном времени (см. панель (B) на фиг. 7). Снижение экспрессии РНК и белка GJB2 было обнаружено в образцах, коэкспрессирующих целевую плазмиду и miR-182 и miR-183, по сравнению с образцами, экспрессирующими только целевую плазмиду. Аналогичные содержащие hGJB2.FLAG плазмиды, которые не включали сайты-мишени miR-182 и miR-183, использовали в качестве контроля и продемонстрировали аналогичные уровни белка hGJB2 с совместной экспрессией miR-182 и miR-183 и без нее (см. панель фиг. 7 (A).) и панель фиг. 7 (B)).

[0386] Специалисты в данной области легко поймут, что существуют альтернативные методы проведения экспериментов, связанные с данным примером, например, альтернативные вирусные титры, MOI, концентрации клеток, время до сбора клеток, реагенты, используемые для сбора клеток, или анализ мРНК или белка, серотипы AAV и/или стандартные модификации конструкции, содержащей ген SLC26A4, являются практичными и ожидаемыми изменениями настоящего примера.

Пример 6. Предварительная оценка переносимости волосковыми клетками трансгенной экспрессии мРНК GJB2 и выработки белка коннексина 26 в неонатальных кохлеарных эксплантатах.

[0387] Этот пример относится к введению и анализу экспрессии конструкций gAAV, сверхэкспрессирующих ген GJB2, в неонатальных кохлеарных эксплантатах. Имитация частиц gAAV или частиц gAAV, содержащих конструкции gAAV (фиг. 2, панели (A)-(L)), инкапсулированные капсидами Anc80, готовят и трансдуцируют в неонатальные кохлеарные эксплантаты при известной MOI (например приблизительно $4,5 \times 10^9$ или $1,3 \times 10^{10}$ гв/улитку). Экспланты выращивают до уровней, подходящих для сбора (например в течение 72 часов после трансдукции), а затем готовят для иммунофлуоресцентного окрашивания/визуализации посредством фиксации с использованием 4% PFA или экстракции РНК. Готовят образцы РНК и подтверждают сверхэкспрессию гена GJB2 с помощью количественной ПЦР с соответствующими реагентами способом, описанным в опубликованном методе (например в соответствии с набором RNeasy Micro Kit и количественной ПЦР в реальном времени) с использованием специфичных для

конструкции праймеров и относительно контроля. Надежная выработка мРНК GJB2 наблюдается в эксплантах, трансдуцированных тестируемым гAAV, по сравнению с событиями имитации трансдукции. Переносимость и отсутствие токсичности волосковых клеток определяют с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания/визуализации, для изображения волосковых клеток внутреннего уха используют антитела, нацеленные на Myo7a (Proteus Biosciences), а для определения положения ядер используют окрашивание DAPI. После сверхэкспрессии GJB2 токсичность волосковых клеток (Myo7) не наблюдается или наблюдается низкая.

[0388] Частицы гAAV Anc80, содержащие конструкции гAAV, управляемые комбинациями промотора/энхансера CAG, CMVe-GJB2p или smCBA, получали и трансдуцировали в неонатальные кохлеарные эксплантаты мышей (P2) при известной MOI (приблизительно $5,8 \times 10^9$, $1,4 \times 10^{10}$ или $1,8 \times 10^{10}$) гв/на улитку, соответственно). Экспланты выращивали до уровней, подходящих для сбора (например в течение 72 часов после трансдукции), а затем готовили для иммунофлуоресцентного окрашивания/визуализации посредством фиксации с использованием 4% PFA. Затем эксплантаты окрашивали DAPI (обозначены синим цветом) и иммуноокрашивали с использованием антител против FLAG (обозначены зеленым цветом) и специфичных для волосковых клеток антител против Myo7a (обозначены красным цветом), после чего экспланты визуализировали (примерные данные представлены на фиг. 6). В эксплантатах, трансдуцированных частицами гAAV, содержащими AAVAnc80-CAG.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (как показано на фиг. 2, панель (F), SEQ ID NO: 82), наблюдали устойчивый специфический для поддерживающих клеток сигнал FLAG в количестве $5,8E9$ гв/эксплантат (см. панель фиг. 6 (A)). Надежный поддерживающий клеточно-специфический сигнал FLAG наблюдался в эксплантах, трансдуцированных частицами гAAV, содержащими AAVAnc80-smCBA.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (как показано на фиг. 2, панель (G), SEQ ID NO: 83) в количестве $1,4E10$ гв/эксплантат. Надежный специфический для поддерживающих клеток сигнал FLAG наблюдался в эксплантах, трансдуцированных частицами гAAV, содержащими AAVAnc80-CMVeGJB2p.5UTR.hGJB2.3F.3UTR (как показано на фиг. 2, панель (H), SEQ ID NO: 84) в количестве $1,8E10$ гв/эксплантат. В образцах были обнаружены различия в экспрессии FLAG, что, вероятно, является результатом изменчивости титра вектора.

Пример 7: Хирургический метод на взрослых мышах

[0389] Настоящий пример относится к введению описанных в настоящем документе конструкций во внутреннее ухо взрослых мышей. Частицы гAAV, содержащие капсид AAV и конструкцию, кодирующую белок коннексин 26 или его характеристическую функциональную часть, готовили в буфере препарата (например искусственной перилимфе или 1xPBS с плюроновой кислотой F68) и затем вводили в барабанную лестницу у мышей, как описано в Shu et al. al., Human Gene Therapy, 27(9):687-699, 2016, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Самцов и самок мышей старше P15 анестезировали с помощью внутрибрюшинной инъекции ксилазина (например

приблизительно 5-10 мг/кг) и кетамина (например приблизительно 90-120 мг/кг). Температуру тела поддерживали на уровне 37°C с помощью электрической грелки. Разрез делали с правой заушной области и обнажали барабанный пузырь и задний полукружный канал. Пузырь перфорировали хирургической иглой, а маленькое отверстие расширяли, чтобы обеспечить доступ к улитке. Кость кохлеарной латеральной стенки барабанной лестницы истончали с помощью стоматологической бормашины так, чтобы латеральная стенка перепонки оставалась интактной. Затем просверливали небольшое отверстие в заднем полукружном канале (PSCC). Проходимость каналостомы подтверждали с помощью визуализации медленного истечения перилимфы. Использовали нанолитровую систему микроинъекций в сочетании со стеклянной микропипеткой для доставки в общей сложности примерно 1 мкл конструкций, содержащих буфер (например конструкций gAAV, описанных в настоящем документе, с концентрацией примерно от $4,5 \times 10^9$ до 5×10^{10} гв/улитку в искусственной перилимфе или 1xPBS с плюроновой кислотой F68) в барабанную лестницу со скоростью приблизительно 2 нл/сек. Стеклянную микропипетку оставляли на 5 минут после инъекции. После кохлеостомии и инъекции отверстие в барабанном пузыре и PSCC закрывали небольшими кусочками жира, а мышцы и кожу сшивали. Мышам давали проснуться от анестезии, и их боль контролировали с помощью 0,15 мг/кг гидрохлорида бупренорфина в течение 3 дней.

Пример 8: Трансгенная экспрессия и визуализация белка коннексина 26 у мышей дикого типа.

[0390] Этот пример относится к трансгенной экспрессии и анализу трансгенного белка коннексина 26 у мышей дикого типа. Мышам дикого типа в улитку вводили частицы AAVAnc80 ($1,2 \times 10^{10}$ гв/улитку), содержащие CAG.hGJB2.F.GFP (схема представлена на фиг. 20), способом, описанным в примере 7. Через 10 дней после введения определяли чистоту и надежность экзогенного коннексина 26 (FLAG; фиолетовый) в перепонке из поддерживающих клеток сенсорного эпителия (фиг. 12, средняя и правая панели). Также во внутренних волосковых клетках определяли экспрессию экзогенного коннексина 26. Эндогенный коннексин 26 (красный) определяли во всех поддерживающих клетках (фиг. 12, левая и правая панели).

Пример 9: Трансгенная экспрессия и визуализация белка коннексина 26 у взрослых мышей с мутацией GJB2.

[0391] Этот пример относится к трансгенной экспрессии и анализу трансгенного белка коннексина 26 у взрослых мышей. Подходящие мыши с мутантным GJB2 могут быть получены после контролируемого во времени индуцированного тамоксифеном нокаута в линиях Sox10-CreER x Cx26^{fllox} или линиях CAG-CreER x Cx26^{fllox}. Взрослых контрольных мышей и мышей с мутантным GJB2 выращивали в соответствии с рекомендациями по защите животных и одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC), и применяли хирургические методы в соответствии с примером 7. Параллельные ложные операции проводили, как указано выше, с вирусом Anc80L65-GFP или носителем в качестве отрицательного контроля. В определенные

моменты времени (например через 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев после операции) мышей собирали для иммунофлуоресцентного окрашивания/визуализации. Все собранные срезы улитки контрольных мышей и мышей с мутантным GJB2 или тотальные препараты визуализировали с использованием DAPI для ядерной экспрессии, антител против коннексина 26 и антител против Myo7 или против фаллоидина.

Пример 10: Трансгенная экспрессия и визуализация белка коннексина 26 у мышей с мутантным GJB2.

[0392] Этот пример относится к трансгенной экспрессии и анализу трансгенного белка коннексина 26 у новорожденных мышей. Подходящие мыши с мутантным GJB2 могут быть получены после контролируемого во времени индуцированного тамоксифеном нокаута в линиях Sox10-CreER x Cx26^{flox} или линиях CAG-CreER x Cx26^{flox}. Новорожденных мышей дикого типа или мышей с мутантным GJB2 в возрасте от P0 до P4 анестезировали (например с помощью гипертермии на льду) для подготовки к введению композиций, описанных в настоящем документе. Имитационные частицы гAAV или конструкции гAAV (как показано на фиг. 2, панели (A)-(L)), инкапсулированные капсидами Anc80, получали и вводили во внутреннее ухо мыши через вторичную барабанную перепонку (RWM) или задний полукружный канал (PSCC). Введение частиц гAAV осуществляли со следующими стадиями: А) преаурикулярный разрез для обнажения улиткового пузыря, В) стеклянные микропипетки (№ по каталогу 4878 - WPI), вытягиваемые с помощью съемника микропипеток (№ по каталогу P87 - инструменты Sutter) до окончательного OD примерно 10 мкм использовали для ручной доставки (микропипетки, удерживаемые микроманипулятором Nanoliter 2000 - WPI) композиций, содержащих частицы гAAV, в барабанную лестницу, что обеспечивает доступ к клеткам внутреннего уха, С) приблизительно 1 мкл композиции, описанной в настоящем документе (например гAAV конструкций примерно от $4,5 \times 10^9$ до 5×10^{10} гв/улитку) вводили в каждую тестируемую улитку со скоростью высвобождения приблизительно 0,3 мкл/мин (контролируется контроллером микроинъекций MICRO4 - WPI). Имитационные операции проводили, как указано выше, с вирусом Anc80L65-GFP или носителем в качестве отрицательного контроля. Обеспечивали восстановление мышей после операции без дополнительного вмешательства. В день P21 оценивали физиологию мышей. Впоследствии или в более поздний момент времени после дополнительных физиологических оценок мышей брали для иммунофлуоресцентной визуализации. Улитковые срезы контрольных мышей или мышей с мутацией GJB2 или тотальные препараты визуализировали с использованием DAPI для ядерной экспрессии, антител против коннексина 26 и антител против Myo7 или против фаллоидина.

Пример 11: Фенотипический анализ трансгенной экспрессии мРНК GJB2 и белка коннексина 26 у мышей с мутантным GJB2.

[0393] Настоящий пример относится к фенотипическому анализу слуха у мышей, которые трансгенно экспрессируют мРНК GJB2 и белок коннексин 26 во внутреннем ухе. Подходящие мыши с мутантным GJB2 могут быть получены после контролируемого во

времени индуцированного тамоксифеном нокаута в линиях Sox10-CreER x Cx26^{flox} или линиях CAG-CreER x Cx26^{flox}. Неонатальных контрольных мышей и мышей с мутантным GJB2 в возрасте от P0 до P4 анестезировали путем гипертермии на льду для подготовки к введению композиций, описанных в настоящем документе. Контроли-носители, ложные частицы gAAV или конструкции gAAV (как показано на фиг. 2, панели (A)-(L)), инкапсулированные капсидами Anc80, получали и вводили во внутреннее ухо мыши через вторичную барабанную перепонку (RWM) или задний полукружный канал (PSCC). Введение частиц gAAV осуществляли со следующими стадиями: А) преаурикулярный разрез для обнажения улиткового пузыря, В) стеклянные микропипетки (№ по каталогу 4878 - WPI), вытягиваемые с помощью съемника микропипеток (№ по каталогу P87 - инструменты Sutter) до окончательного OD примерно 10 мкм использовали для ручной доставки (микропипетки, удерживаемые микроманипулятором Nanoliter 2000 - WPI) композиций, содержащих частицы gAAV, в барабанную лестницу, что обеспечивает доступ к клеткам внутреннего уха, С) 1 мкл композиции, описанной в настоящем документе (например gAAV конструкций примерно от $4,5 \times 10^9$ до 5×10^{10} гв/улитку) вводили в каждую тестируемую улитку со скоростью высвобождения приблизительно 0,3 мкл/мин (контролируется контроллером микроинъекций MICRO4 - WPI). Имитационные операции проводили, как указано выше, с вирусом Anc80L65-GFP или носителем в качестве отрицательного контроля. Обеспечивали восстановление мышей после операции без дополнительного вмешательства.

[0394] В определенные моменты времени тестирования (например 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев после операции) контрольных мышей и мышей с мутантным GJB2, которым была сделана односторонняя инъекция композиции, подвергали анестезии пентобарбиталом натрия (например приблизительно 35 мг /кг), вводимым внутрибрюшинно. Затем мышей помещали и содержали в держателе для головы в заземленной и акустически и электрически изолированной испытательной комнате. Систему обнаружения вызванных потенциалов (например Smart EP 3.90, Intelligent Hearing Systems, Miami, FL, USA) использовали для измерения порогов слухового вызванного потенциала ствола головного мозга (ABR) у мышей. Для вызова ABR у подопытных мышей использовали звуки щелчков, а также всплески тонов частотой 8, 16 и 32 кГц различной интенсивности (от 10 до 130 дБ SPL). Ответные сигналы регистрировали с помощью подкожного игольчатого электрода, вводимого вентролатерально в уши мышей. Мыши с фиктивной инъекцией выступали в качестве отрицательного контроля, в то время как имитация инъекции в ухо может выступать в качестве внутреннего контроля для тестов ABR, улучшение эффективности ABR наблюдается в тестовых ушах по сравнению с контрольными ушами и/или животными.

Пример 12: Фенотипический анализ трансгенной экспрессии мРНК GJB2 и белка коннексина 26 у взрослых мышей с мутантным GJB2.

[0395] Этот пример относится к фенотипическому анализу слуха у взрослых мышей, трансгенно экспрессирующих белок коннексин 26. Подходящие мыши с мутантным GJB2

могут быть получены после контролируемого во времени индуцированного тамоксифеном нокаута в линиях Sox10-CreER x Cx26^{fllox} или линиях CAG-CreER x Cx26^{fllox}. Контрольных мышей и мышей с мутантным GJB2 выращивали в соответствии с рекомендациями по защите животных, одобренными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC), и после достижения подходящего возраста использовали хирургические методы в соответствии с примером 7. Параллельные ложные операции проводили, как указано выше, либо с буфером состава носителя, либо с Anc80L65-GFP в качестве отрицательного контроля. В определенные моменты времени (например 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев после операции) мышей анестезировали (например пентобарбиталом натрия в дозе приблизительно 35 мг/кг или ксилазином в дозе приблизительно 5-10 мг/кг), и внутрибрюшинно вводили кетамин в дозе приблизительно 90-120 мг/кг). Затем мышей помещали и содержали в держателе для головы в заземленной и акустически и электрически изолированной испытательной комнате. Систему обнаружения вызванных потенциалов (Smart EP 3.90, Intelligent Hearing Systems, Miami, FL, USA) использовали для измерения порогов слухового вызванного потенциала ствола головного мозга (ABR) у мышей. Для вызова ABR у подопытных мышей использовали звуки щелчков, а также всплески тонов частотой 8, 16 и 32 кГц различной интенсивности (от 10 до 130 дБ SPL). Сигналы ответа регистрировали с помощью подкожного игольчатого электрода, вводимого вентrolатерально в уши мышей. Улучшение функции слуха наблюдали в иллюстративных результатах у взрослых мышей с мутацией GJB2, которым односторонне инъецировали композиции, как описано в настоящем документе. Мыши с фиктивной инъекцией выступали в качестве отрицательного контроля, в то время как имитация уха может выступать в качестве контроля для тестов ABR, улучшение характеристик ABR наблюдали в тестовых ушах по сравнению с контрольными ушами и/или животными.

Пример 13: Неинвазивное пренатальное тестирование материнской крови для обнаружения мутации GJB2

[0396] Этот пример относится к тестированию материнской крови для определения генотипа GJB2 потомства до рождения, чтобы способствовать быстрому и эффективному терапевтическому вмешательству. Образцы материнской крови (20-40 мл) собирали в пробирки для бесклеточной ДНК (cfDNA). Из каждого образца выделяли по меньшей мере 7 мл плазмы по протоколу двойного центрифугирования при 2000 g в течение 20 минут, затем при 3220 g в течение 30 минут с переносом супернатанта после первого центрифугирования. cfDNA выделяли из 7-20 мл плазмы с использованием набора QIAGEN QIAmp Circulating Nuclei Acid и элюировали в 45 мкл буфера TE. Чистую материнскую геномную ДНК выделяли из лейкоцитарной пленки, полученной после первого центрифугирования.

[0397] Путем объединения термодинамического моделирования анализов для выбора зондов с минимальной вероятностью взаимодействия зонд-зонд с подходами к амплификации, описанными ранее (Stiller et al., 2009 Genome Res 19(10):1843-1848,

который полностью включен в настоящем документе посредством ссылки), может быть достигнуто мультиплексирование 11000 анализов. Образцы материнской cfDNA и материнской геномной ДНК предварительно амплифицировали в течение 15 циклов с использованием 11000 специфических к мишени анализов, а аликвоту переносили во вторую реакцию ПЦР из 15 циклов с использованием вложенных праймеров. Образцы готовили для секвенирования путем добавления меток со штрих-кодом в третьем раунде ПЦР из 12 циклов. Мишени включают SNP, соответствующие более чем 200 мутациям в GJB2, которые, как известно, приводят к DFNB1, DFNA3, синдрому Барта-Памфри, иглистому ихтиозу с глухотой (HID), ладонно-подошвенной кератодермии с глухотой, синдрому кератит-ихтиоз-глухота (KID) или синдрому Вохвинкеля, и/или последовательности, которые охватывают все экзоны GJB2, чтобы обнаружить любой неизвестный в настоящее время, но потенциально патогенный вариант. Необязательно последовательности, соответствующие другим генам коннексина, которые амплифицируют для выявления возможных гетерологичных дигенных случаев DFNB1, DFNA3, синдрома Барта-Памфри, иглистого ихтиоза с глухотой (HID), ладонно-подошвенной кератодермии с глухотой, синдрома кератита-ихтиоза-глухоты (KID) или синдрома Вохвинкеля. Затем ампликоны секвенировали с помощью секвенатора Illumina HiSeq. Выравнивание последовательности генома выполняли с использованием коммерчески доступного программного обеспечения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует белок коннексин 26.
2. Конструкция по п. 1, в которой кодирующей последовательностью является ген GJB2.
3. Конструкция по п. 2, в которой геном GJB2 является ген GJB2 примата.
4. Конструкция по п. 2 или 3, в которой геном GJB2 является ген GJB2 человека.
5. Конструкция по п. 4, в которой ген GJB2 человека содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
6. Конструкция по п. 4 или 5, в которой ген GJB2 человека содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1.
7. Конструкция по п. 1, в которой белком коннексином 26 является белок коннексин 26 примата.
8. Конструкция по п. 1 или 7, в которой белком коннексином 26 является белок коннексин 26 человека.
9. Конструкция по п. 8, в которой белок коннексин 26 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7.
10. Конструкция по любому из пп. 1-9, в которой промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, тканеспецифический промотор или селективный к поддерживающим клеткам промотор.
11. Конструкция по любому из пп. 1-10, в которой промотор представляет собой специфический для клеток внутреннего уха промотор.
12. Конструкция по п. 11, в которой промотор представляет собой эндогенный промотор гена GJB2.
13. Конструкция по п. 12, в которой промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 17.
14. Конструкция по п. 11, в которой специфический для клеток внутреннего уха промотор представляет собой промотор GJB6, промотор SLC26A4, промотор TECTA, промотор DFNA5, промотор COCH, промотор NDP, промотор SYN1, промотор GFAP, промотор PLP, промотор TAK1, промотор SOX21, промотор SOX2, промотор FGFR3, промотор PROX1, промотор GLAST1, промотор LGR5, промотор HES1, промотор HES5, промотор неCH1, промотор JAG1, промотор CDKN1A, промотор CDKN1B, промотор SOX10, промотор P75, промотор CD44, промотор HEY2, промотор LFNG, промотор GDF6, промотор IGFBP2, промотор RBP7, промотор PARM1, минимальный промотор GJB2 или промотор S100b.
15. Конструкция по п. 11, в которой промотор способен экспрессировать полинуклеотид в поддерживающих клетках внутреннего уха, выбранных из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних

столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hes), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc), клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (KO), фибробластов и других клеток латеральной стенки, клеток большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90).

16. Конструкция по п. 14, в которой специфический для клеток внутреннего уха промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с любой из SEQ ID NO: 16, 17, 61, 91, 54, 55, 56, 57, 62, 90, 95, 98, 101 и 104.

17. Конструкция по любому предыдущему пункту, в которой конститутивный промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV или промотор CB7.

18. Конструкция по п. 17, в которой промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

19. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторный сайт-мишень микроРНК (miRTS) для микроРНК, экспрессируемой в клетке внутреннего уха.

20. Конструкция по п. 19, в которой микроРНК представляет собой одну или несколько из miR-194, miR-140, miR-18a, miR-99a, miR-30b, miR-15a, miR182 или miR-183.

21. Конструкция по п. 19, в которой микроРНК экспрессируется в одной или нескольких волосковых клетках, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках или м спирального лимба внутреннего уха.

22. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в волосковых клетках внутреннего уха.

23. Конструкция по п. 22, в которой микроРНК представляет собой одну или несколько из miR-194, miR-140, miR-18a, miR-99a, miR-30b, miR-15a, miR182 или miR-183.

24. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в клетках спирального ганглия.

25. Конструкция по п. 24, в которой микроРНК выбирают из одной или нескольких из miR-194, miR-18a, miR-99a, miR-30b, miR-15a, miR182 или miR-183.

26. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в латеральных поддерживающих клетках.

27. Конструкция по п. 26, в которой микроРНК выбирают из одной или нескольких из miR-99a, miR-30b или miR-15a.

28. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в клетках

базиллярной мембраны.

29. Конструкция по п. 28, в которой микроРНК выбирают из одной или нескольких из miR-99a, miR-30b или miR-15a.

30. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в медиальных поддерживающих клетках.

31. Конструкция по п. 30, в которой микроРНК выбирают из одной или нескольких из miR182 и miR-183.

32. Конструкция по п. 21, в которой микроРНК экспрессируется в клетках спирального лимба.

33. Конструкция по п. 32, в которой микроРНК выбирают из одной или нескольких из miR182 и miR-183.

34. Конструкция по любому из пп. 19-33, в которой регуляторный сайт-мишень микроРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты с идентичностью по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% с любой из SEQ ID NO: 78, 79, 107, 108, 109, 110, 111 или 112.

35. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, причем конструкция дополнительно содержит 5'-UTR.

36. Конструкция по п. 35, в которой 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты по любому из SEQ ID NO: 20, 21 или 66.

37. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, причем конструкция дополнительно содержит 3'-UTR.

38. Конструкция по п. 37, в которой 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты по любому из SEQ ID NO: 22, 67, 68 или 69.

39. Конструкция по любому из пп. 35-38, в которой 3'-UTR и/или 5'-UTR содержит miRTS.

40. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая хвост полиА.

41. Конструкция по п. 40, в которой хвост полиА представляет собой гормон роста крупного рогатого скота, мышинный β -глобин, мышинный α -глобин, человеческий коллаген, вирус полиомы, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), ген тяжелой цепи IgG, гормон роста человека или поздний или ранний полиА сайт SV40.

42. Конструкция по п. 41, в которой хвост полиА представляет собой полиА гормона роста крупного рогатого скота.

43. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая 5'- и 3'-инвертированный концевой повтор (ITR), в которой 5'-ITR и 3'-ITR фланкируют промотор и полинуклеотид.

44. Конструкция по п. 43, в которой 5'-ITR и 3'-ITR представляют собой ITR AAV, полученные из серотипа, выбранного из ITR AAV1, AAV2, AAV3 (например AAV3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV Anc80.

45. Конструкция по пп. 43-44, в которой ITR AAV получены из серотипа AAV2.
46. Конструкция по пп. 43-45, в которой 5'-ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8 или 52.
47. Конструкция по пп. 43-46, в которой 3'-ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 9 или 53.
48. Конструкция по пп. 46-47, в которой:
 - (i) 5'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8, а 3'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 9; или
 - (ii) 5'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 52, а 3'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 52.
49. Конструкция по любому из пп. 43-48, в которой (i) 5'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8 или 52 (ii) 5'-UTR содержит нуклеиновую кислоту по любому из SEQ ID NO: 20, 21 или 66 (iii) промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты по любому из SEQ ID NO: 10-17, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 90, 91, 95, 98, 101 или 104 (iv) 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 22, 67, 68 или 69 и (v) 3'-ITR содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 9 или 53.
50. Конструкция по п. 49, в которой 3'-UTR и/или 5'-UTR содержит miRTS.
51. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно любому из SEQ ID NO: 45-51, 50-51, 82-88, 94, 97, 100, 103 и 106.
52. Конструкция по любому из предыдущих пунктов, причем конструкцией является кассета экспрессии.
53. Вектор, содержащий конструкцию по любому из предыдущих пунктов.
54. Вектор по п. 53, причем вектор представляет собой вектор млекопитающих или вирусов.
55. Вектор по п. 54, причем вектор представляет собой вирусный вектор.
56. Вектор по п. 55, причем вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса или лентивирусного вектора.
57. Вектор по п. 56, причем вирусный вектор представляет собой AAV вектор.
58. Частица AAV, содержащая конструкцию по любому из предыдущих пунктов.
59. Частица AAV по п. 58, дополнительно содержащая капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой или получен из капсида AAV1, AAV2, AAV3 (например AAV3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV Anc80.
60. Частица AAV по п. 59, в которой капсид AAV представляет собой капсид AAV Anc80.
61. Композиция, содержащая конструкцию по любому из пп. 1-52, вектор по любому из пп. 53-57 или частицу AAV по любому из пп. 58-60.
62. Композиция по п. 61, причем композиция представляет собой фармацевтическую композицию, при этом композиция необязательно дополнительно содержит

фармацевтически приемлемый носитель.

63. Композиция по п. 61 или 62, причем фармацевтическая композиция представляет собой синтетический раствор перилимфы.

64. Клетка *ex vivo*, содержащая конструкцию по любому из пп. 1-52, вектор по любому из пп. 53-57 или частицу AAV по пп. 58-60.

65. Клетка *ex vivo* по п. 64, причем клетка *ex vivo* представляет собой клетку внутреннего уха.

66. Клетка *ex vivo* по п. 65, причем клетка *ex vivo* представляет собой поддерживающую клетку внутреннего уха.

67. Клетка *ex vivo* по п. 66, причем поддерживающие клетки внутреннего уха выбирают из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hec), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc), клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (KO), фибробластов и других клеток латеральной стенки, клеток большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90).

68. Способ, включающий трансдукцию клеток *ex vivo*:

(i) конструкцией по любому из пп. 1-52 или вектор по любому из пп. X; и

(ii) одной или несколькими хелперными плазмидами, совместно содержащими ген AAV Rep, ген AAV Cap, ген AAV VA, ген AAV E2a и ген AAV E4.

69. Способ по п. 68, в котором клетка *ex vivo* представляет собой клетку внутреннего уха.

70. Способ по п. 69, в котором клетка *ex vivo* представляет собой поддерживающую клетку внутреннего уха.

71. Способ по п. 70, в котором поддерживающие клетки внутреннего уха выбирают из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hec), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc), клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (KO), фибробластов и других клеток латеральной стенки, клеток большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90).

72. Способ экспрессии коннексина 26 в поддерживающих клетках внутреннего уха нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60, композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

73. Способ увеличения экспрессии коннексина 26 в поддерживающих клетках внутреннего уха нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по

любому из пп. 58-60, композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

74. Способ по п. 72-73, в котором экспрессию коннексина 26 снижают, подавляют или устраняют в поддерживающих клетках не внутреннего уха.

75. Способ уменьшения экспрессии коннексина 26 в поддерживающих клетках не внутреннего уха, включающий введение субъекту конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60, композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

76. Способ по любому из пп. 72-75, в котором поддерживающие клетки внутреннего уха выбирают из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hsc), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc), клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (KO), фибробластов и других клеток латеральной стенки, клеток большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90).

77. Способ уменьшения токсичности, связанной с экспрессией коннексина 26 в клетке внутреннего уха, включающий введение субъекту конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60, композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

78. Способ по п. 77, в котором клетки внутреннего уха выбирают из волосковых клеток внутреннего уха, клеток спирального ганглия, латеральных поддерживающих клеток, клеток базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клеток, клеток спирального лимба, клеток внутренней борозды или любой их комбинации.

79. Способ лечения потери слуха у субъекта с заболеванием или с риском потери слуха, включающий введение субъекту конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60, композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

80. Способ по п. 75-79, в котором экспрессию коннексина 26 снижают, подавляют или устраняют в волосковых клетках внутреннего уха, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации.

81. Способ по любому из пп. 75-80, в котором токсичность, вызванную экспрессией коннексина 26, снижают в волосковых клетках внутреннего уха, клетках спирального ганглия, латеральных поддерживающих клетках, клетках базилярной мембраны, медиальных поддерживающих клетках, клетках спирального лимба, клетках внутренней борозды или любой их комбинации

82. Способ по п. 72-81, в котором коннексин 26 преимущественно экспрессируется в поддерживающих клетках внутреннего уха.

83. Способ по п. 82, в котором поддерживающие клетки внутреннего уха выбирают из одной или нескольких из внутренних фаланговых клеток/пограничных клеток (IPhC), внутренних столбовых клеток (IPC), наружных столбовых клеток (OPC), 1 и 2 рядов клеток Дейтерса (DC1/2), 3 ряда клеток Дейтерса (DC3), клеток Гензена (Hsc), клеток Клаудиуса/клеток наружной борозды (CC/OSC), интердентальных клеток (Idc), клеток внутренней борозды (ISC), клеток органа Келликера (KO), фибробластов и других клеток латеральной стенки, клеток большого эпителиального гребня (GER) (включая латеральные клетки большого эпителиального гребня (LGER)) и клетки OC90+ (OC90).

84. Способ по любому из пп. 72-83, в котором введение проводят во внутреннее ухо субъекта.

85. Способ по п. 84, в котором введение проводят в улитку субъекта.

86. Способ по п. 85, в котором введение проводят посредством инъекции во вторичную барабанную перепонку.

87. Способ по любому из пп. 72-86, дополнительно включающий измерение уровня слуха субъекта.

88. Способ по п. 87, в котором уровень слуха измеряют путем проведения теста на слуховой вызванный потенциал ствола головного мозга (ABR).

89. Способ по п. 87 или 88, дополнительно включающий сравнение уровня слуха субъекта с эталонным уровнем слуха.

90. Способ по п. 89, в котором эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень слуха.

91. Способ по п. 89, в котором уровень слуха субъекта измеряют после введения композиции по пп. 61-63, а эталонный уровень слуха представляет собой уровень слуха субъекта, который измеряли перед введением композиции по пп. 61-63.

92. Способ по любому из пп. 72-91, дополнительно включающий измерение уровня белка коннексина 26 у субъекта.

93. Способ по п. 92, в котором уровень белка коннексина 26 измеряют во внутреннем ухе субъекта.

94. Способ по п. 92 или 93, в котором уровень белка коннексина 26 измеряют в улитке субъекта.

95. Способ по любому из пп. 92-94, дополнительно включающий сравнение уровня белка коннексина 26 у субъекта с эталонным уровнем белка коннексина 26.

96. Способ по п. 95, в котором эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень белка коннексина 26.

97. Способ по п. 95, в котором уровень белка коннексина 26 у субъекта измеряют после введения композиции по п. 61-63, а эталонный уровень белка коннексина 26 представляет собой уровень белка коннексина 26 у субъекта, который измеряли перед введением композиции по п. 61-63.

98. Применение конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60 или композиции по любому из пп. 61-63 или

клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67 для лечения потери слуха у субъекта с заболеванием или с риском потери слуха.

99. Применение конструкции по любому из пп. 1-52, вектора по любому из пп. 53-57, частицы AAV по любому из пп. 58-60 или композиции по любому из пп. 61-63 или клетки *ex vivo* по любому из пп. 64-67 при изготовлении лекарственного средства для лечения потери слуха.

100. Конструкция по любому из пп. 1-52, вектор по любому из пп. 53-57, частица AAV по любому из пп. 58-60 или композиция по любому из пп. 61-63 или клетка *ex vivo* по любому из пп. 64-67 для применения в качестве лекарственного средства.

101. Конструкция по любому из пп. 1-52, вектор по любому из пп. 53-57, частица AAV по любому из пп. 58-60, композиция по любому из пп. 61-63 или клетка *ex vivo* по любому из пп. 64-67 для применения при лечении потери слуха.

102. Набор, содержащий конструкцию по любому из пп. 1-52, вектор по любому из пп. 53-57, частицу AAV по любому из пп. 58-60, композицию по любому из пп. 61-63 или клетку *ex vivo* по любому из пп. 64-67.

103. Набор по п. 102, в котором конструкцию, вектор, частицу AAV, композицию или клетку *ex vivo* предварительно загружают в устройство.

104. Набор по п. 103, в котором устройство представляет собой микрокатетер.

105. Набор по п. 104, в котором микрокатетер имеет такую форму, чтобы его можно было ввести в полость среднего уха через наружный слуховой канал, а конец микрокатетера ввести в контакт с RWM.

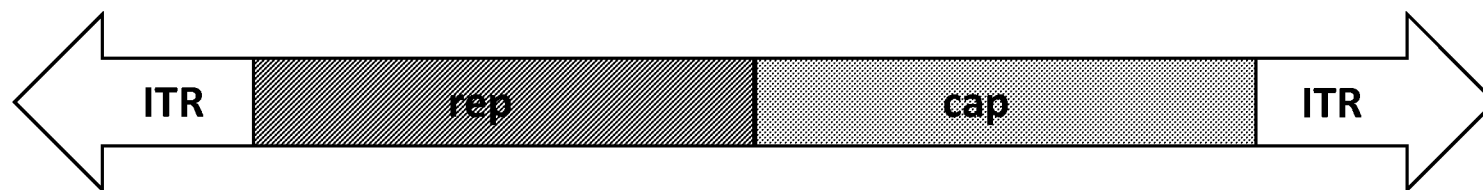
106. Набор по п. 104 или 105, в котором дистальный конец микрокатетера состоит по меньшей мере одной микроиглы с диаметром от 10 до 1000 микрон.

107. Набор по п. 102, дополнительно содержащий устройство.

108. Набор по п. 107, в котором устройство представляет собой устройство, описанное на любой из фиг. 8-11.

109. Набор по п. 108, в котором устройство содержит иглу, содержащую изогнутую часть и изогнутый наконечник.

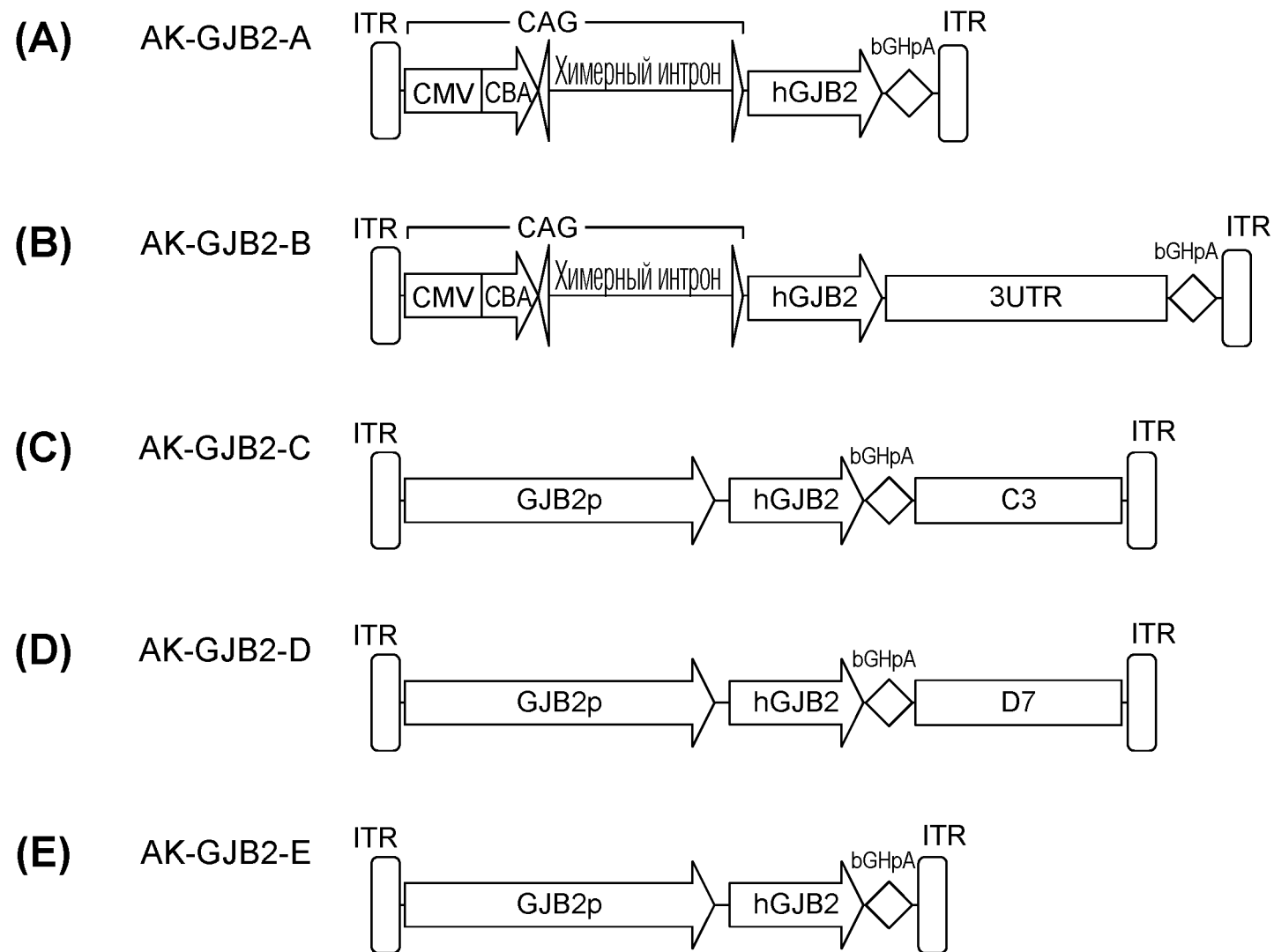
(A)



(B)

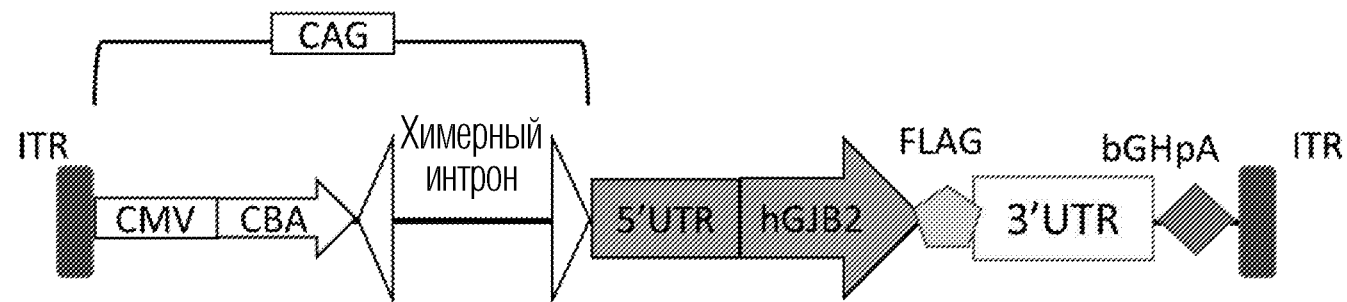


ФИГ. 1

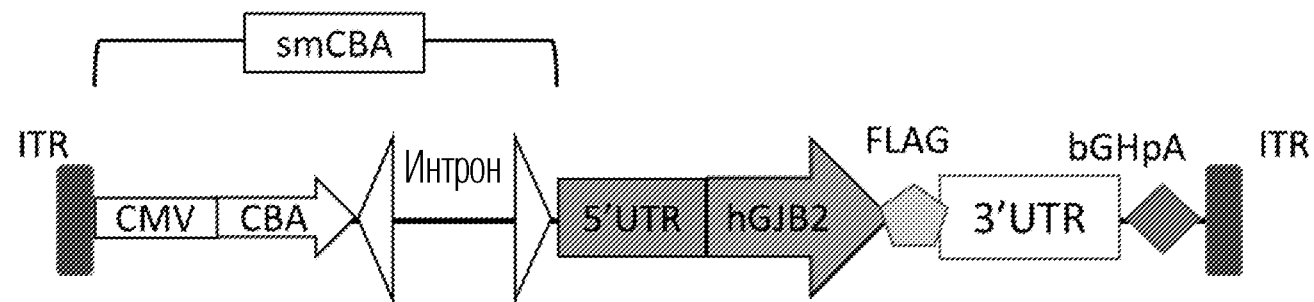


ФИГ. 2

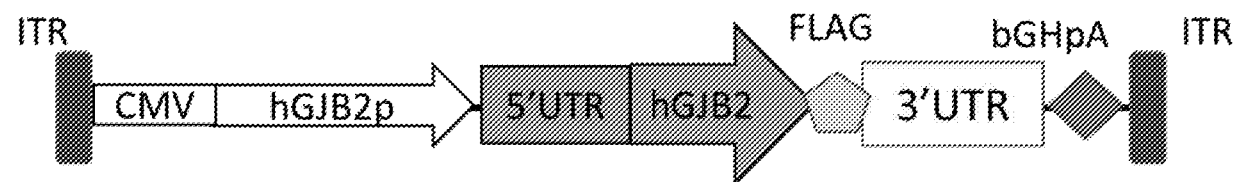
(F) AK-GJB2-F



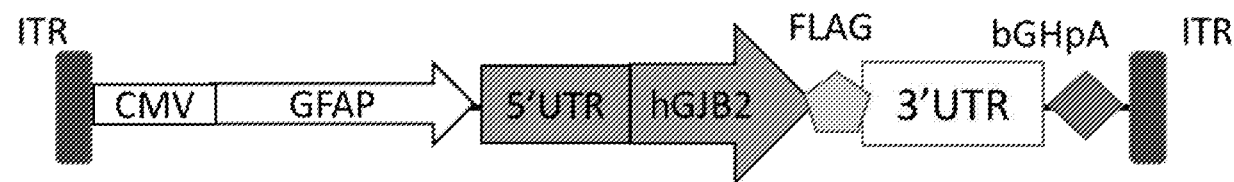
(G) AK-GJB2-G



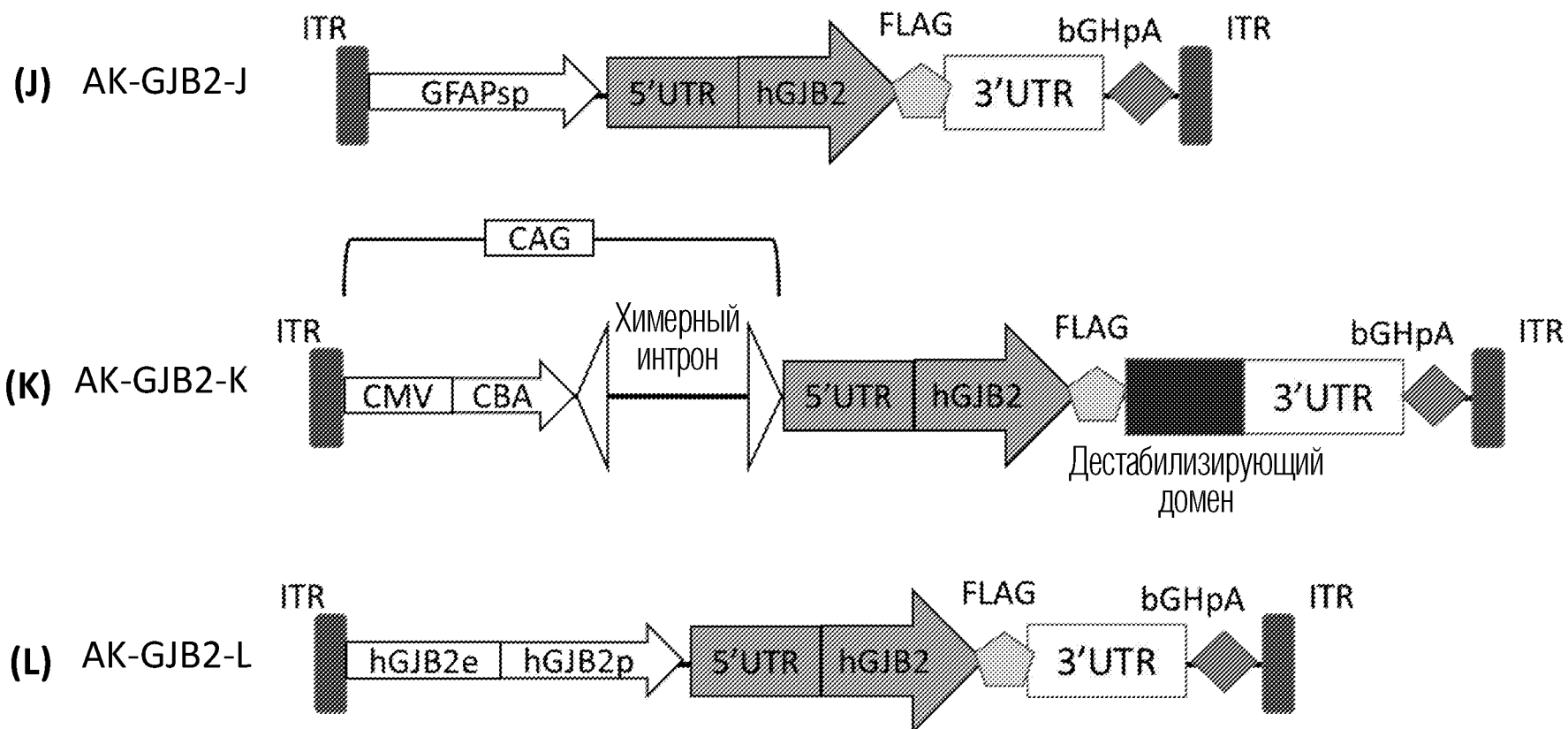
(H) AK-GJB2-H



(I) AK-GJB2-I



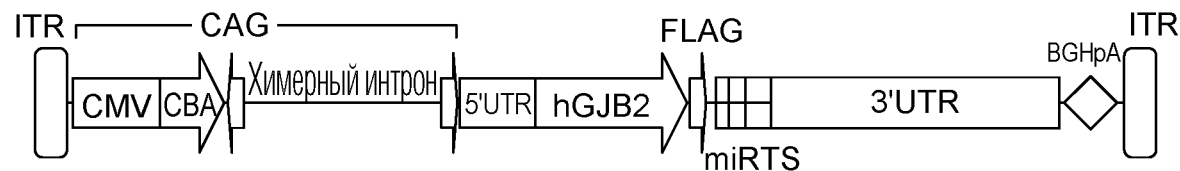
ФИГ. 2 (Продолжение)



ФИГ. 2 (Продолжение)

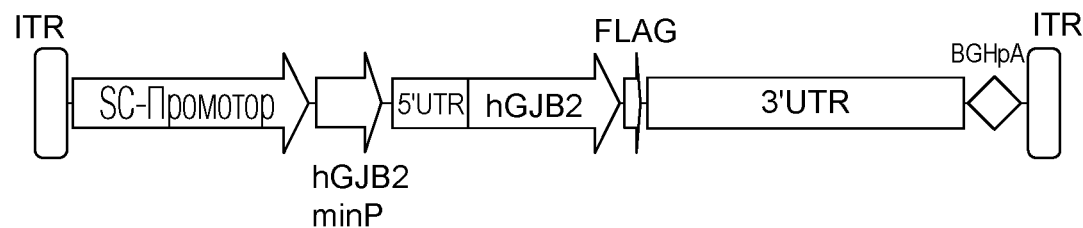
(M) AK-GJB2-M

CAG.5UTR.hGJB2.FLAG.miRTS.3UTR



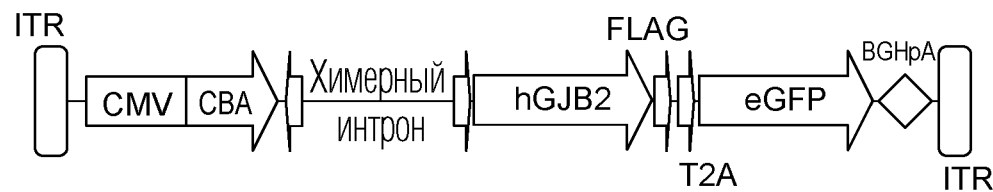
(N) AK-GJB2-N

SCp.hGJB2minp.5UTR.hGJB2.FLAG.3UTR

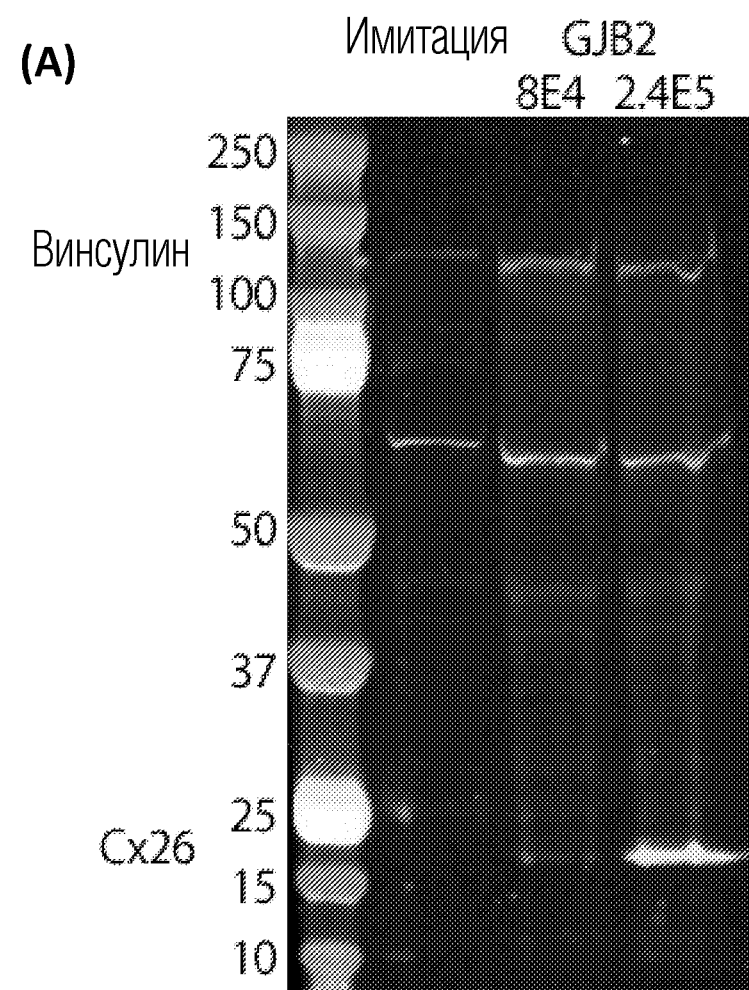


(O) AK-GJB2-O

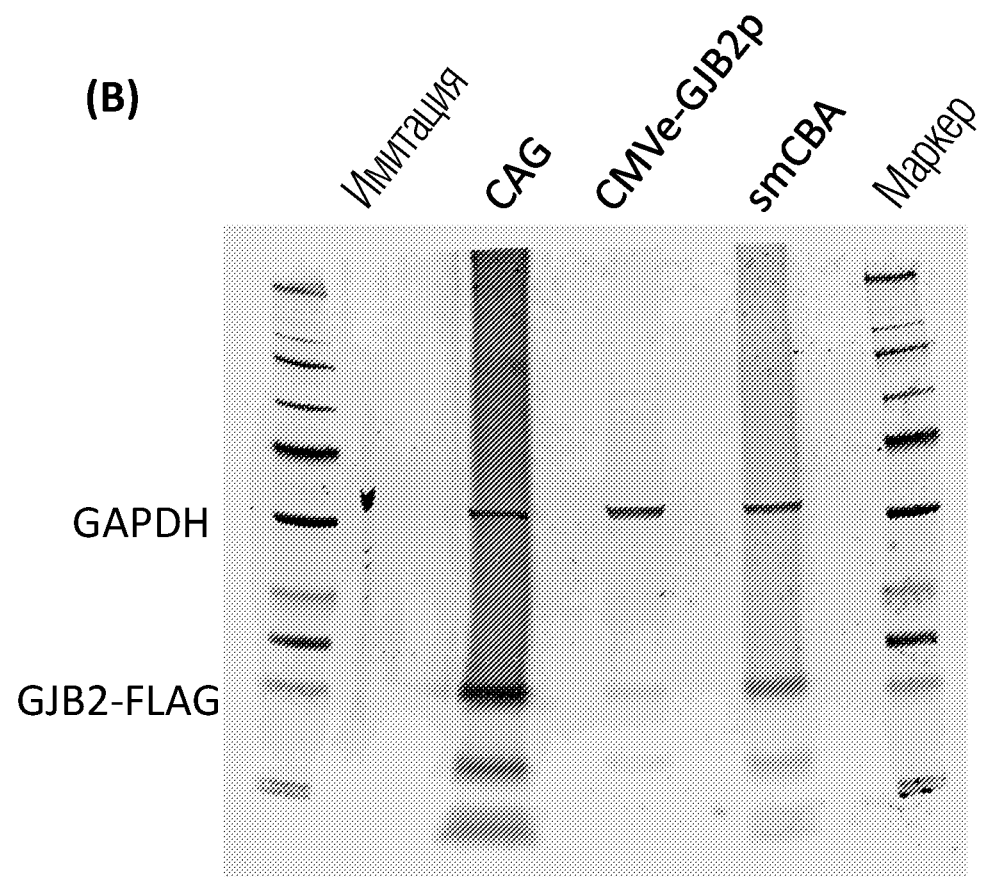
CAG.hGJB2.FLAG.GFP



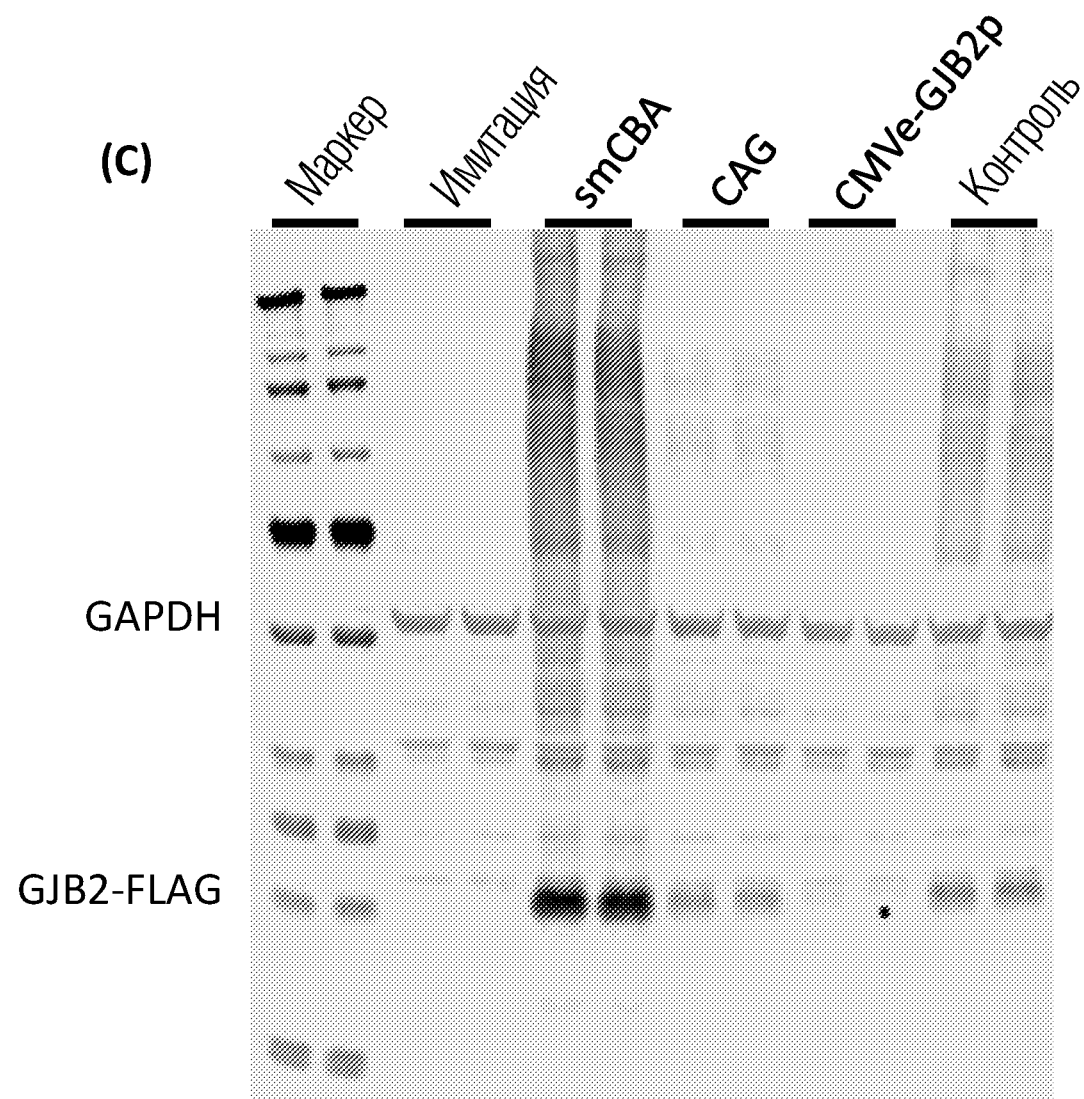
ФИГ. 2 (Продолжение)



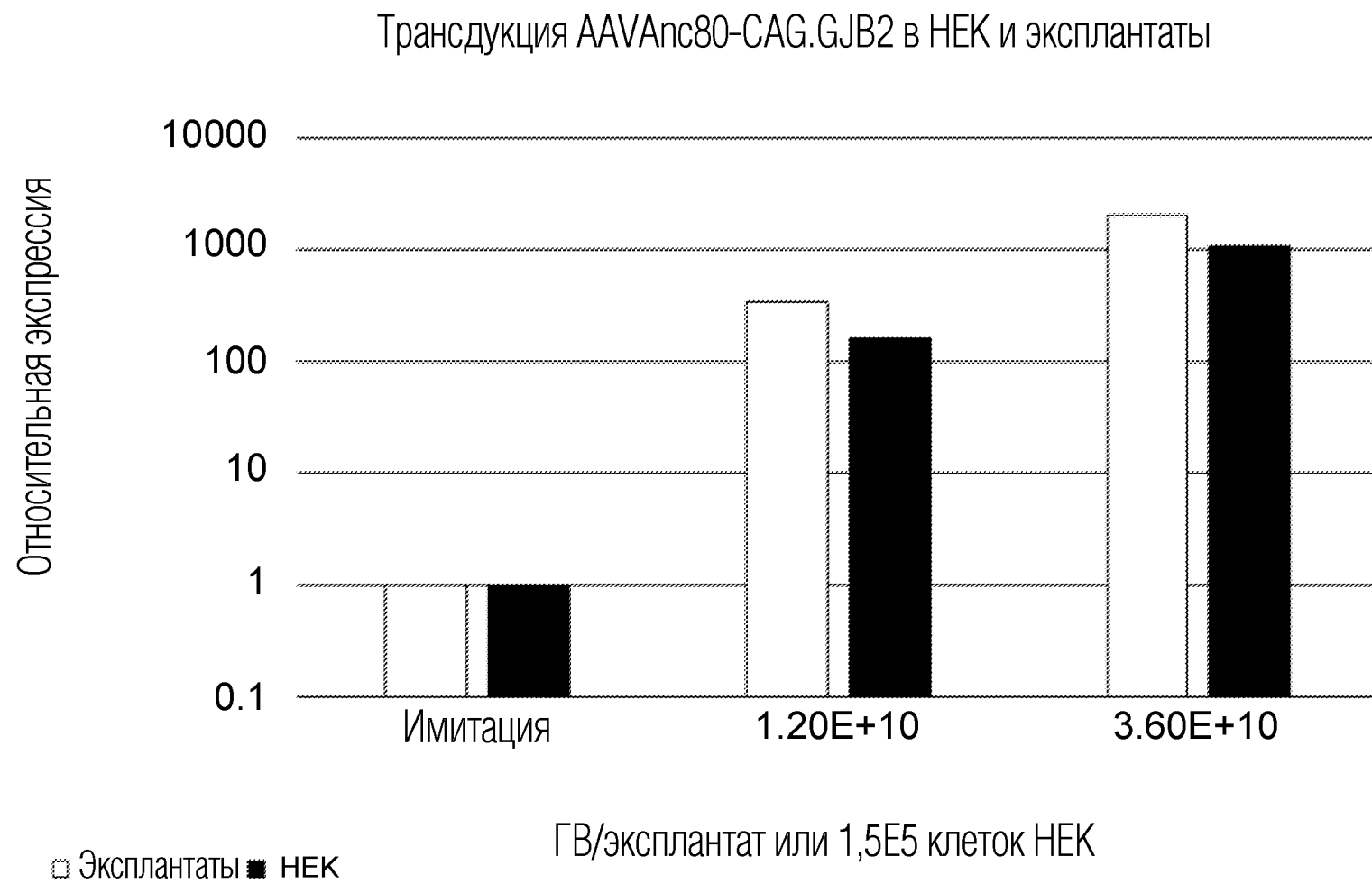
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

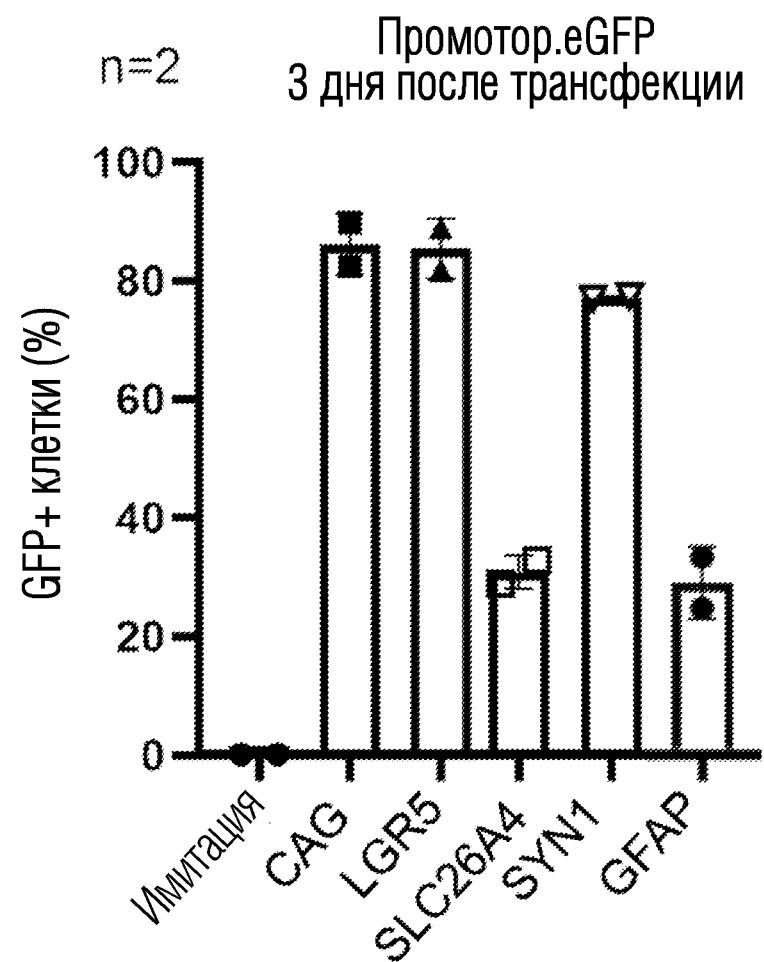


ФИГ. 3С



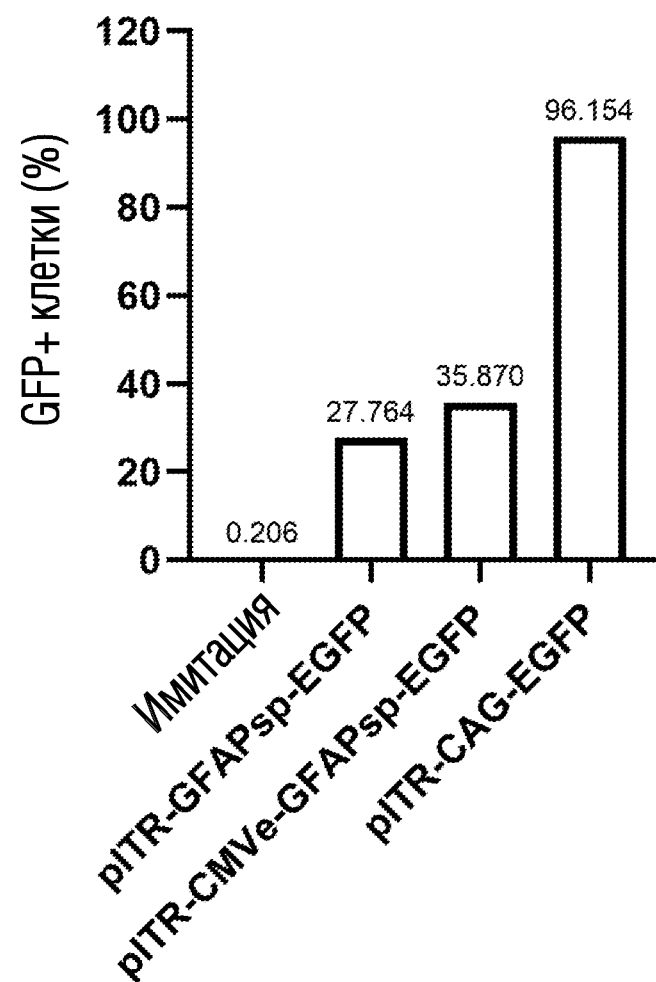
ФИГ. 4

(A)



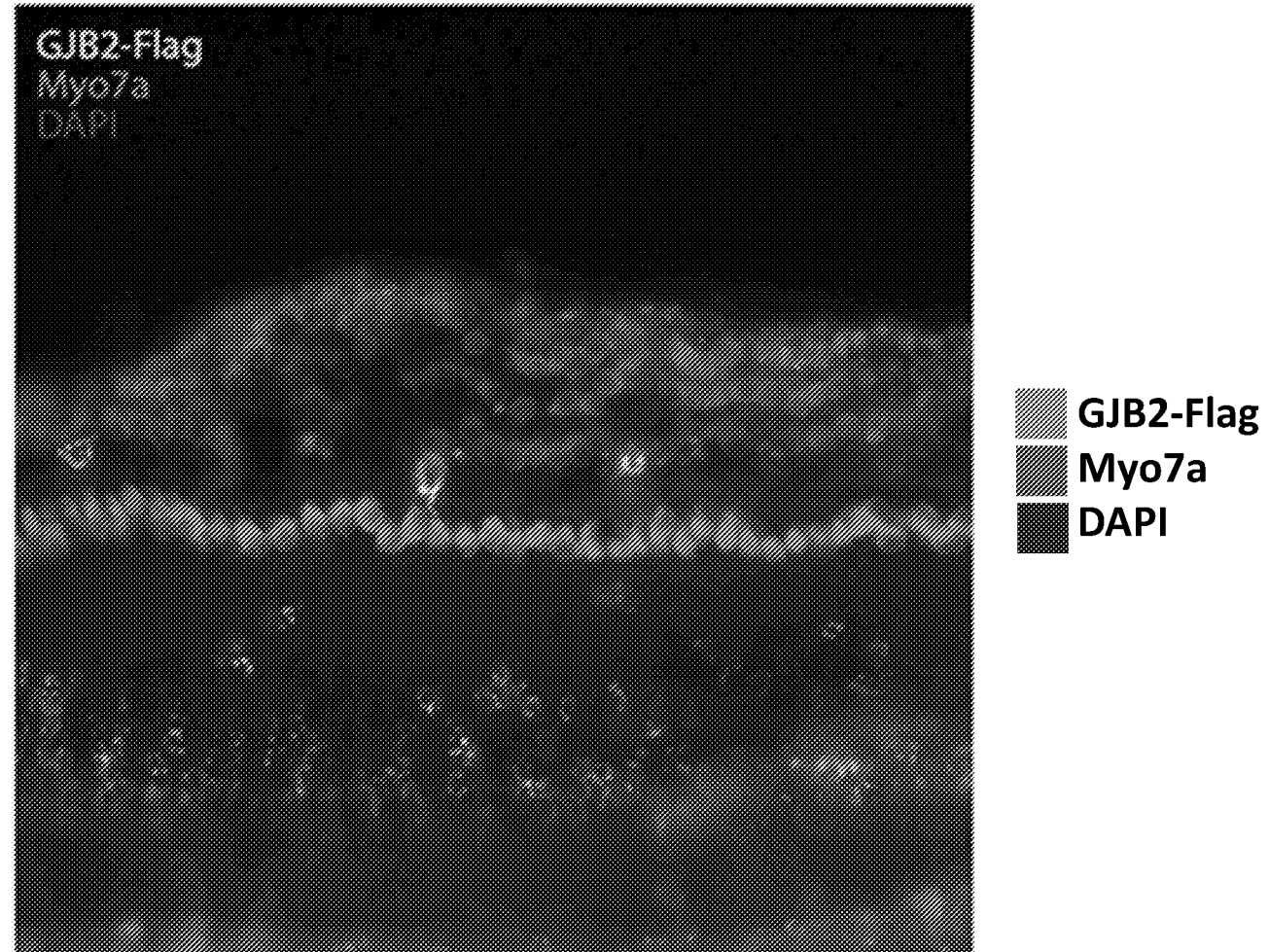
ФИГ. 5А

(B)



ФИГ. 5В

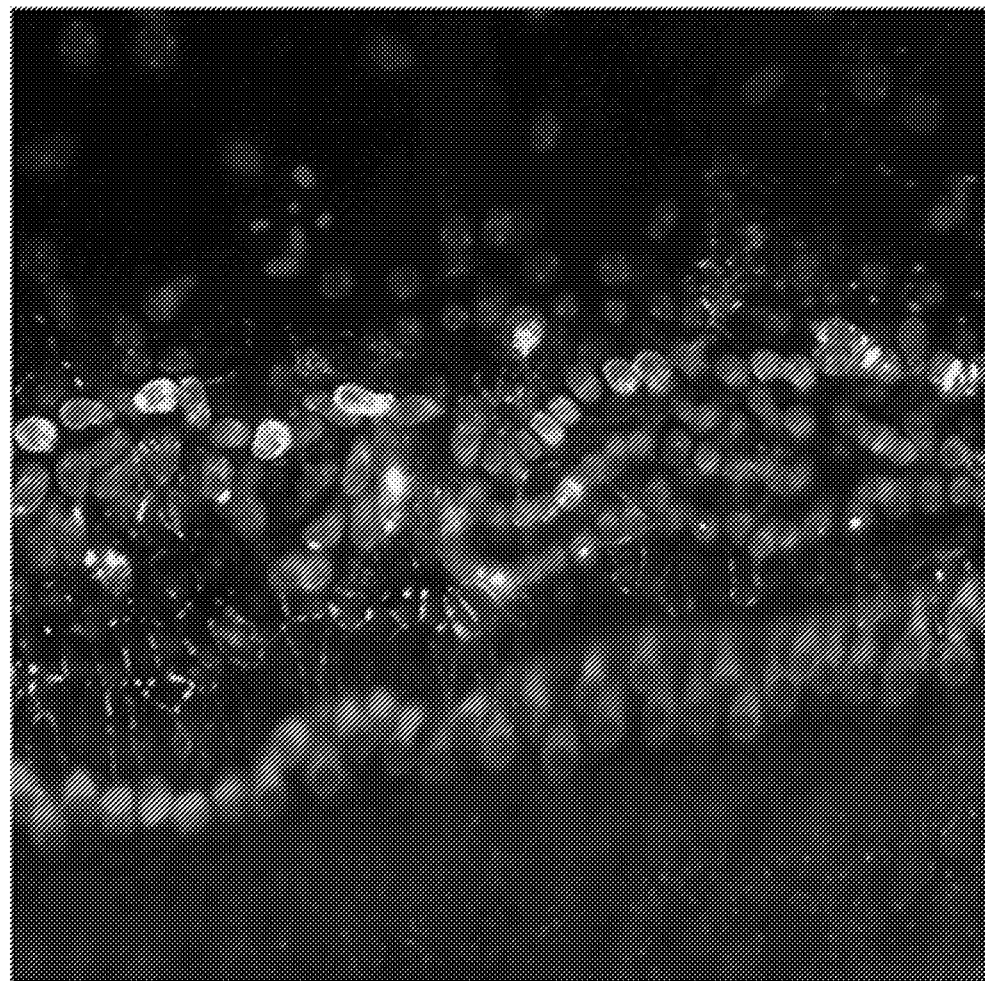
(A) AAVAnc80-CAG.5UTR.hGJB2.3F.3UTR; 5.8E9 гв/эксплантат



12/21

ФИГ. 6А

(B) AAVAnc80-smCBA.5UTR.hGJB2.3F.3UTR; 1.4E10 гв/эксплантат

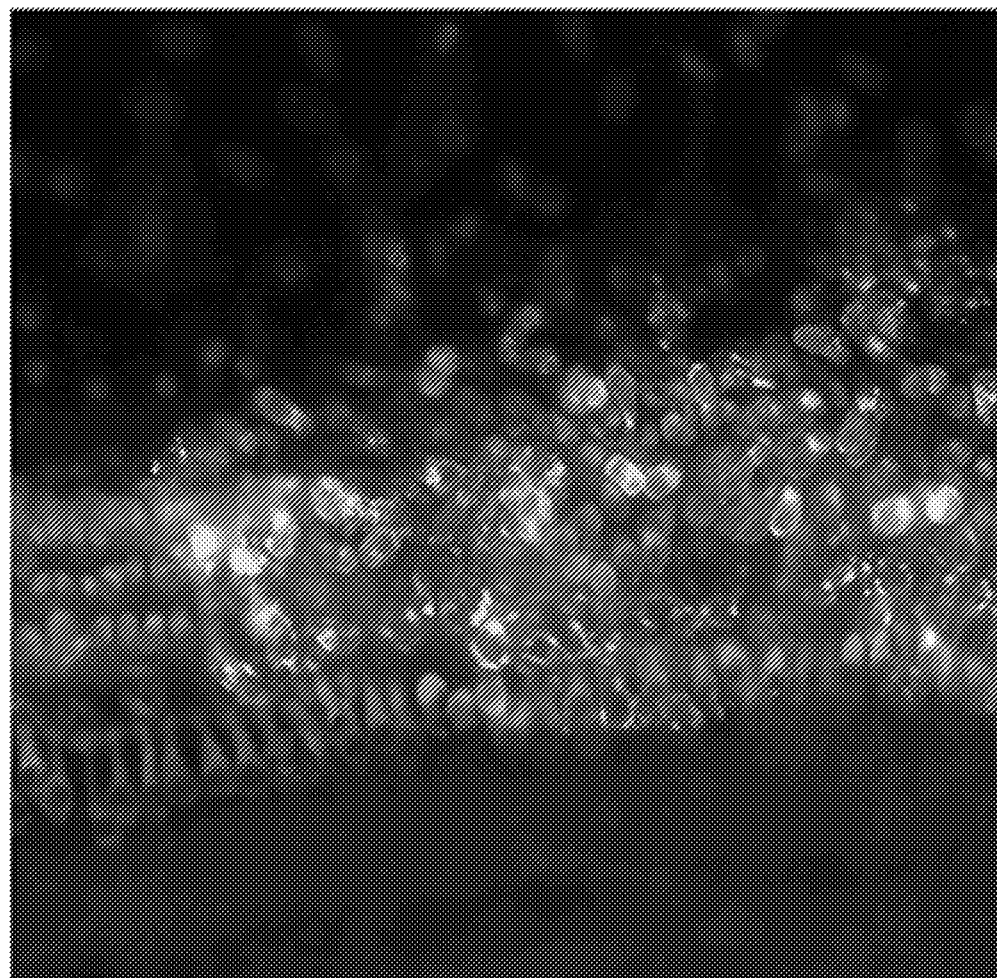


GJB2-Flag
Myo7a
DAPI

13/21

ФИГ. 6В

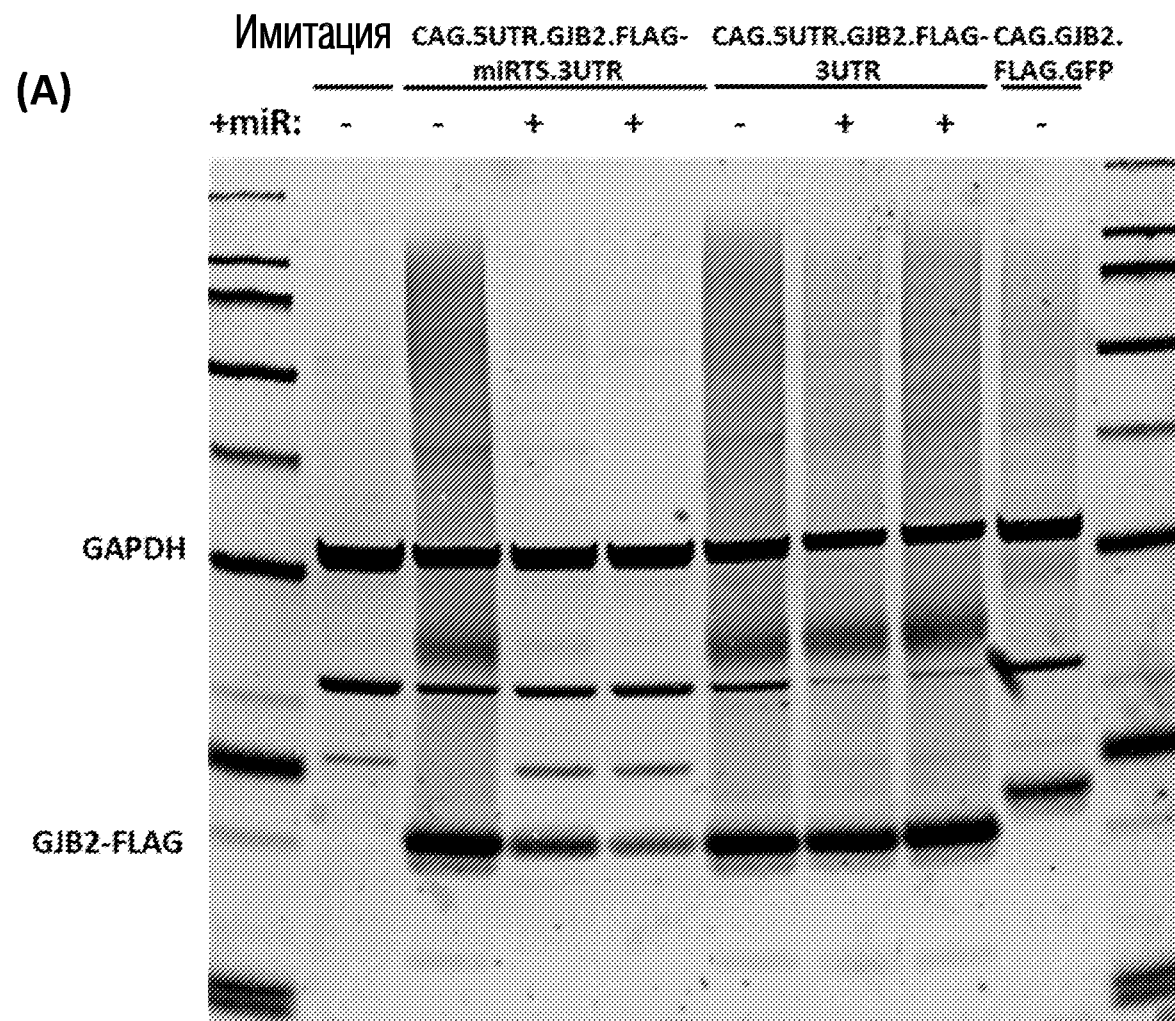
(C) AAVAnc80-CMVhGJB2p.5UTR.hGJB2.3F.3UTR; 1.8E10 ГВ/эксплантат



GJB2-Flag
Myo7a
DAPI

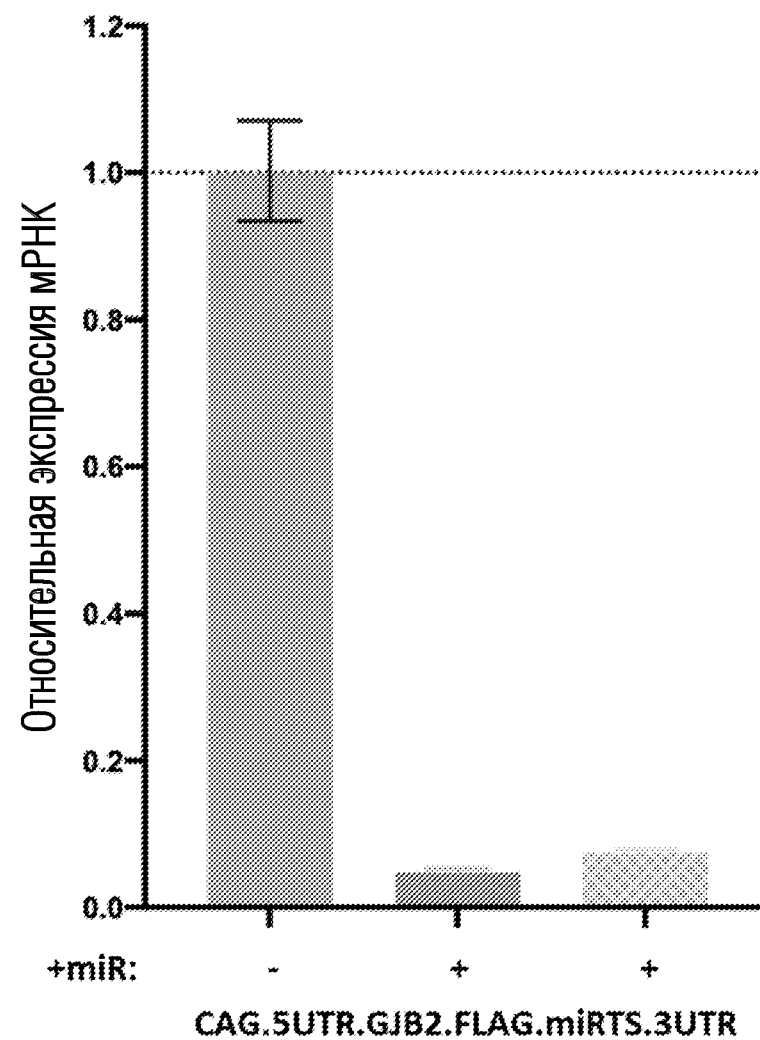
14/21

ФИГ. 6С

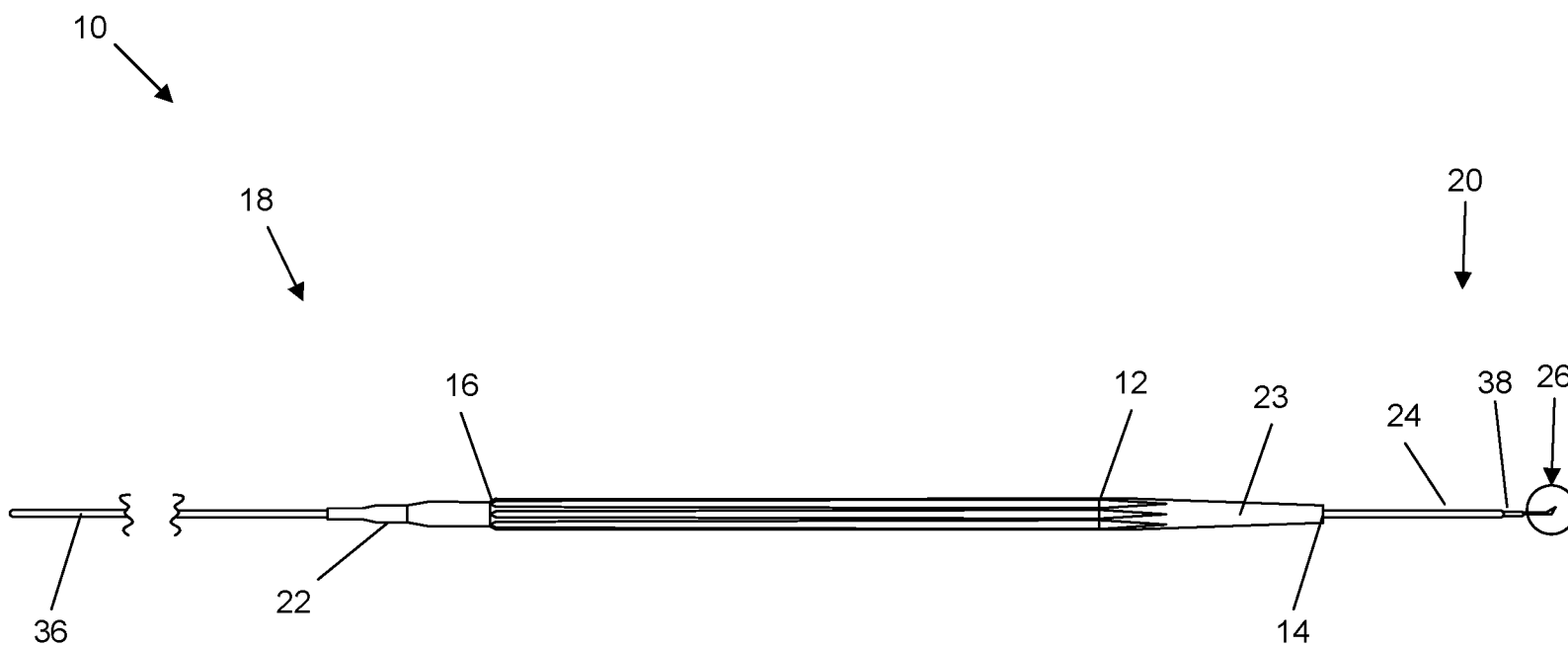


ФИГ. 7А

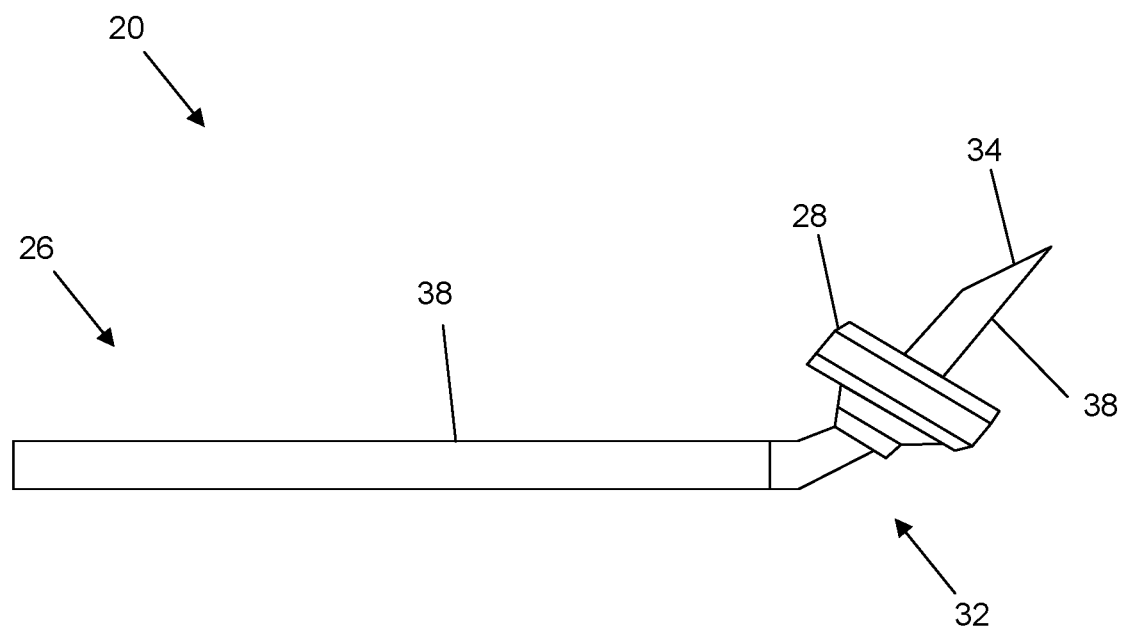
(B)



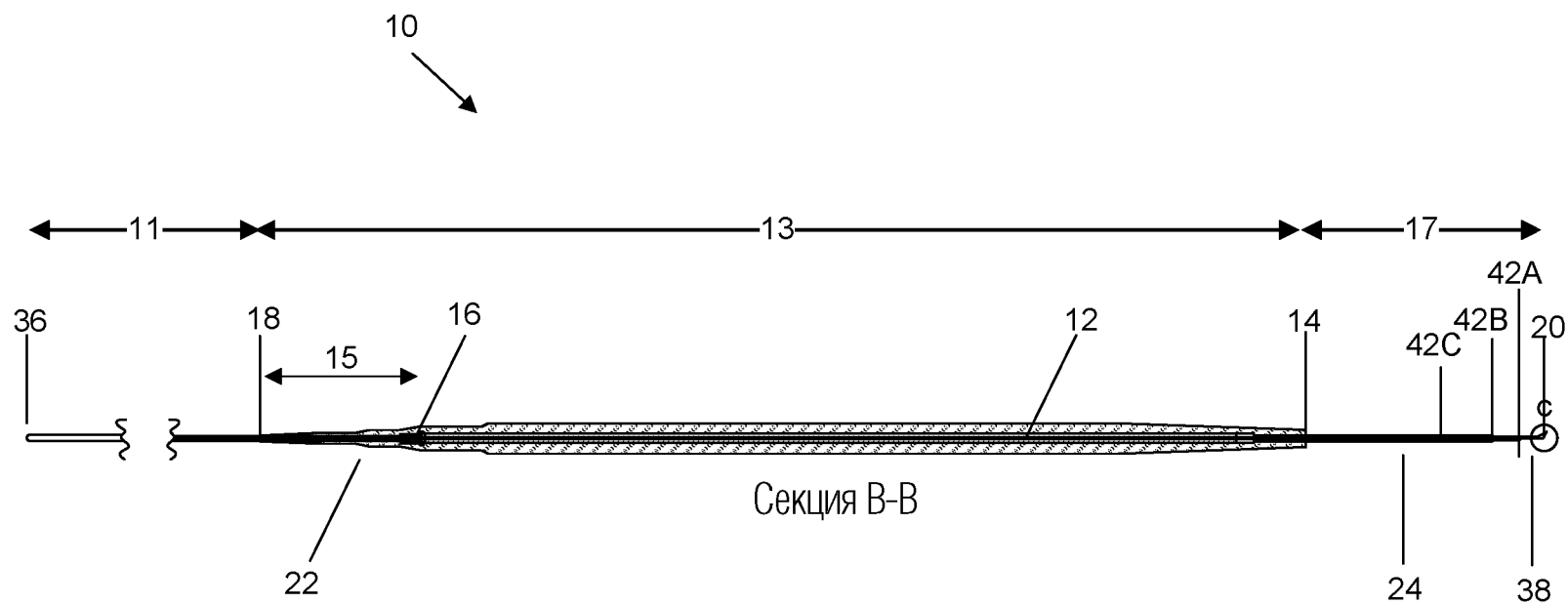
ФИГ. 7В



ФИГ. 8

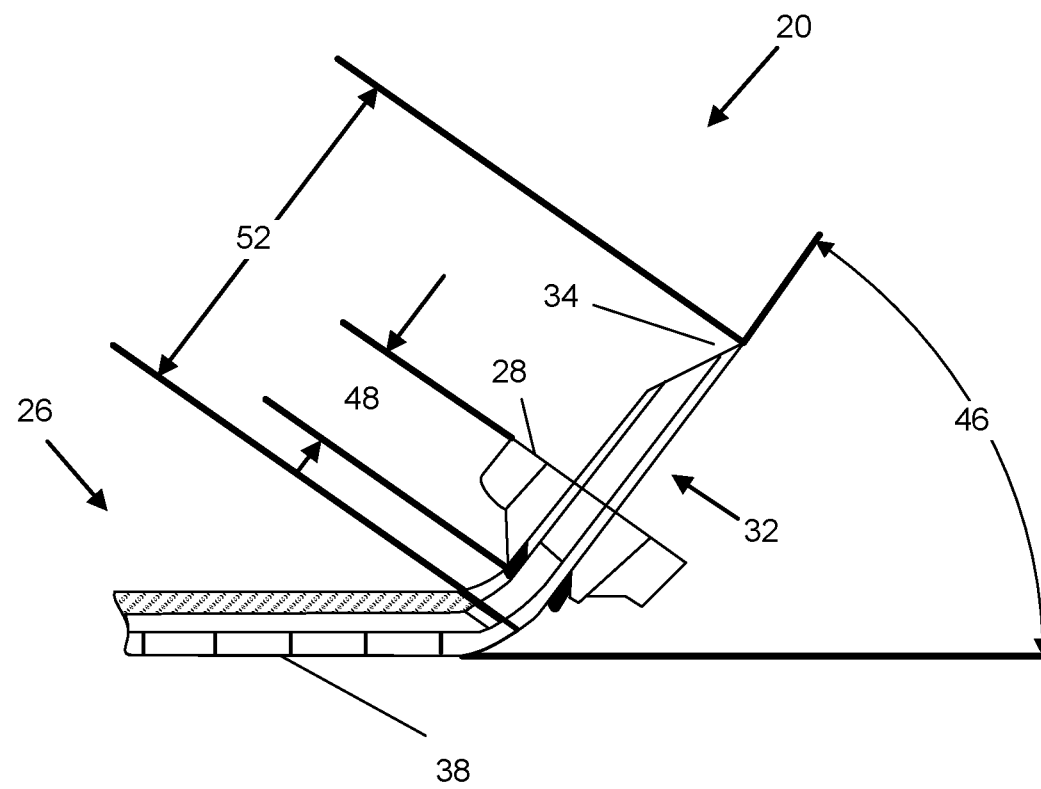


ФИГ. 9

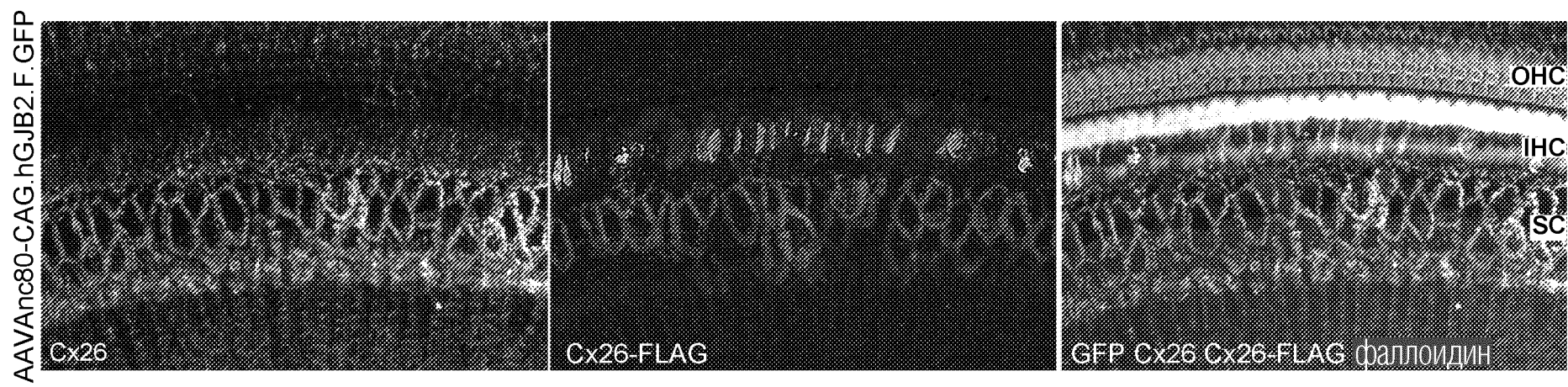


19/21

ФИГ. 10



ФИГ. 11



21/21

ФИГ. 12