

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391873** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.20

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 27/16* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.12.22

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ CLRN1-АССОЦИИРОВАННОЙ ПОТЕРИ СЛУХА И/ИЛИ ЗРЕНИЯ**

(31) 63/131,413

(32) 2020.12.29

(33) US

(86) PCT/US2021/064924

(87) WO 2022/146839 2022.07.07

(71) Заявитель:  
АКУОС, ИНК. (US)

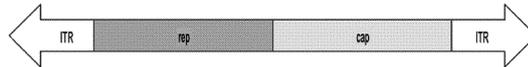
(72) Изобретатель:

Саймонс Эммануэль Джон, Нг Роберт  
(US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина  
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,  
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.  
(RU)

(57) В настоящем изобретении предложены конструкции, содержащие кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует белок кларин 1. Иллюстративные конструкции включают конструкции AAV. Также предложены способы применения раскрытых конструкций при лечении потери слуха и/или глухоты. Также предложены способы применения раскрытых конструкций при лечении потери зрения.



**202391873**  
**A1**

**202391873**  
**A1**

# **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ CLRN1-АССОЦИИРОВАННОЙ ПОТЕРИ СЛУХА И/ИЛИ ЗРЕНИЯ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

**[0001]** Эта заявка претендует на приоритет по отношению к предварительным заявкам на патент США 63/131413, поданным 29 декабря 2020 г., полное содержание которых настоящим включено посредством ссылки.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0002]** Потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей в слуховом проходе или среднем ухе), нейросенсорной (возникающей во внутреннем ухе или слуховом нерве) или смешанной. Большинство форм несиндромальной глухоты связаны с необратимой потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота), хотя некоторые формы могут включать изменения в среднем ухе (кондуктивная потеря слуха). Подавляющее большинство случаев нейросенсорной тугоухости человека вызвано патологическими изменениями в волосковых клетках кортиева органа в улитке (недостаточная функция волосковых клеток). Волосковые клетки могут быть атипичными при рождении или могут быть повреждены в течение жизни человека (например, в результате шумовой травмы или инфекции).

**[0003]** Потеря зрения, также известная как нарушение зрения или зрительное расстройство, представляет собой снижение способности видеть, например, до такой степени, что ее невозможно исправить с помощью таких средств, как очки. Причины потери зрения чрезвычайно разнообразны и варьируются от состояний, влияющих на глаза, до состояний, влияющих на центры обработки изображений в головном мозге. Например, потеря зрения у пациентов, страдающих синдромом Ашера типа III или пигментной дистрофией сетчатки, происходит по мере того, как светочувствительные клетки сетчатки постепенно ухудшаются и в конечном итоге атрофируются. Другие примеры потери зрения включают диабетическую ретинопатию, глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна и катаракту.

## **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0004]** В настоящем раскрытии представлено подтверждение того, что заболевания или состояния, ассоциируемые с потерей слуха, можно лечить, например, путем замены или добавления определенных генных продуктов. В настоящем раскрытии дополнительно предусматривается, что генные продукты, вовлеченные в развитие, функционирование

и/или клетке, например, поддержание волос клеток внутреннего уха, могут быть применимы для лечения заболеваний или состояний, связанных с потерей волосковых клеток и/или поддерживающих клеток (например, поддерживающих волосковых клеток). Таким образом, в настоящем раскрытии предложено введение композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, вовлеченные в развитие, функционирование и/или поддержание клеток внутреннего уха, включая поддерживающие клетки и волосковые клетки, и/или использование таких композиций в лечении потери слуха или заболеваний или состояний, ассоциированных с потерей слуха. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может быть закодирован геном CLRN1 или его характерной частью. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой белок кларин 1 или его характерную часть.

**[0005]** В настоящем раскрытии дополнительно представлено подтверждение того, что заболевания или состояния, ассоциируемые с потерей зрения, можно лечить, например, путем замены или добавления определенных генных продуктов. В настоящем раскрытии дополнительно предусматривается, что генные продукты, вовлеченные в развитие, функционирование и/или клетке, например, поддержание клеток глаза, могут быть применимы для лечения заболеваний или состояний, связанных с потерей клеток глаза и/или поддерживающих клеток (например, поддерживающих клеток глаза). Таким образом, в настоящем раскрытии предложено введение композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, вовлеченные в развитие, функционирование и/или поддержание клеток глаза, включая поддерживающие клетки, и/или использование таких композиций в лечении потери зрения или заболеваний или состояний, ассоциированных с потерей зрения. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может быть закодирован геном CLRN1 или его характерной частью. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой белок кларин 1 или его характерную часть.

**[0006]** В настоящем раскрытии также предусмотрено, что частицы AAV могут быть применимы для введения композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, вовлеченных в развитие, функционирование и/или поддержание клеток внутреннего уха, и/или в лечении потери слуха, или заболеваний или состояний, ассоциированных с потерей слуха. В настоящем раскрытии также предусмотрено, что частицы AAV могут быть применимы для введения композиций, которые приводят к экспрессии генных продуктов, вовлеченных в развитие, функционирование и/или поддержание клеток глаза, и/или в лечении потери зрения, или заболеваний или состояний, ассоциированных с потерей зрения. Как описано в данном документе, частицы AAV содержат (i) полинуклеотидную

конструкцию AAV (например, рекомбинантную полинуклеотидную конструкцию AAV) и (ii) капсид, содержащий капсидные белки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная конструкция AAV содержит ген CLRN1 или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV, описанные в настоящем документе, называются частицами гAAV-CLRN1 или гAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV, описанные в настоящем документе, называются частицами гAAV Anc80-CLRN1 или гAAV Anc80-CLRN1.

**[0007]** В настоящем раскрытии дополнительно предложены композиции, содержащие полинуклеотидные конструкции, содержащие ген CLRN1 или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления конструкция может дополнительно включать регуляторные элементы, функционально присоединенные к кодирующей последовательности. В определенных вариантах осуществления включенные регуляторные элементы способствуют тканеспецифической экспрессии на физиологически приемлемых уровнях.

**[0008]** Также в данном документе предложены способы введения описанных в данном документе конструкций и композиций. В определенных вариантах осуществления введение включает хирургическое вмешательство и доставку частиц гAAV, содержащих терапевтические конструкции. В определенных вариантах осуществления частицы AAV могут быть доставлены во внутреннее ухо нуждающегося в этом субъекта путем хирургического введения через мембрану круглого окна. В некоторых вариантах осуществления эффективность вмешательства определяют с помощью установленных тестов, а показатели сравнивают с контрольными или эталонными значениями.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**[0009]** Объем настоящего раскрытия определяется прилагаемой формулой изобретения и не ограничивается определенными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Специалистам в данной области техники, читающим настоящее описание, будут известны различные модификации, которые могут быть эквивалентны таким описанным вариантам осуществления или иным образом входить в объем формулы изобретения. В общем, используемые в данном документе термины соответствуют их понимаемому значению в данной области техники, если не указано иное. Явные определения определенных терминов приведены ниже; значения этих и других терминов в конкретных случаях в данном описании будут понятны специалистам в данной области из контекста.

**[0010]** Использование в формуле изобретения порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и т. д., для модификации элемента пункта формулы

изобретения само по себе не подразумевает какого-либо приоритета, первоочередности или порядка одного элемента формулы изобретения относительно другого или временного порядка, в котором проводятся действия для осуществления способа, но они используются исключительно как метки для отличия одного элемента формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (за исключением использования порядкового термина), для отличия элементов формулы изобретения.

**[0011]** Упоминания единственного числа настоящем документе следует понимать как включающие множественное число, если явно не указано иное. Пункты формулы изобретения или описания, которые включают «или» между одним или более представителями группы, считаются удовлетворенными, если один, более чем один или все представители группы присутствуют, применяются или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если не указано иное или иное не следует из контекста. В некоторых вариантах осуществления ровно один член группы присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. В некоторых вариантах осуществления более чем один или все из группы членов присутствуют в, применяются в или иным образом относится к данному продукту или способу. Следует понимать, что настоящее раскрытие охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько ограничений, элементов, положений, описательных терминов и т. д. одного или нескольких из перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы настоящему изобретению зависимый от того же независимого пункта (или, если применимо, любого другого пункта), если не указано иное, или если специалисту в данной области техники не будет очевидно потенциальное противоречие или несоответствие. Когда элементы представлены в виде списков (например, в формате группы Маркуша или схожих форматах), следует понимать, что каждая подгруппа элементов также раскрывается, и любой элемент (элементы) можно удалить из группы. Следует понимать, что, в общем, когда варианты осуществления или аспекты упоминаются как «содержащие» конкретные элементы, признаки и т. д. определенные варианты осуществления или аспекты «состоят» или «состоят по существу из» таких элементов, признаков и т. д. В целях упрощения такие варианты осуществления не во всех случаях конкретно изложены в данном документе в таком количестве слов. Следует также понимать, что любой вариант осуществления или аспект могут быть явно исключены из формулы изобретения, независимо от того, указано ли конкретное исключение в описании.

**[0012]** Во всем описании, когда полинуклеотид или полипептид представлен последовательностью букв (например, А, С, G и Т, которые обозначают аденозин, цитидин, гуанозин и тимидин, соответственно, в случае полинуклеотида), такие полинуклеотиды или

полипептиды представлены в порядке от 5' к 3' или от N-конца к C-концу слева направо.

**[0013] Введение.** В контексте данного документа термин «введение», как правило, относится к введению композиции субъекту или системе для достижения доставки средства субъекту или системе. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой композицию или включено в нее; в некоторых вариантах осуществления средство образуется в результате метаболизма композиции или одного или более ее компонентов. Специалистам в данной области известно множество путей, которые, при соответствующих обстоятельствах, могут быть использованы для введения субъекту, например человеку. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть систематическим или местным. В некоторых вариантах осуществления системное введение может быть внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение может быть местным. Местное введение может включать доставку к перилимфе улитки посредством, например, инъекции через мембрану круглого окна или в барабанную лестницу, инъекции в канал улитки через эндолимфу, перилимфу и/или эндолимфу после каналомиии. Местное введение также может включать доставку в глаз посредством, например, внутриглазной инъекции (например, инъекции в стекловидное тело, интравитреальной инъекции, субретинальной инъекции, супрахориоидальной инъекции (например, с использованием системы субретинальной доставки Orbit™ (Orbit SDS) (Gyroscope Therapeutics)) или инъекции в сетчатку). См., например, Ochakovski et al., “Retinal Gene Therapy: Surgical Vector Delivery in the Translation to Clinical Trials”, Front. Neurosci. April 3, 2017 or “OCT – Assisted Delivery of Luxturna” by Ninel Z Gregori and Janet Louise David, <https://www.aaof.org/clinical-video/oct-assisted-delivery-of-luxturna> (July 19, 2018), раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления введение может включать только однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может включать применение фиксированного количества доз. В некоторых вариантах осуществления введение может включать дробное введение (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическое введение (например, индивидуальные дозы, разделенные общим периодом времени). В некоторых вариантах осуществления введение может включать непрерывное введение (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

**[0014] Аллель.** В контексте данного документа термин «аллель» относится к одному из двух или более существующих генетических вариантов конкретного полиморфного геномного локуса.

**[0015] Улучшение.** В контексте данного документа термин «улучшение» относится к предотвращению, уменьшению или смягчению состояния или улучшению состояния

субъекта. Улучшение может включать полное выздоровление или полное предотвращение заболевания, нарушения или состояния, но не требует этого.

**[0016]** *Аминокислота.* В самом широком смысле в контексте данного документа термин «аминокислота» относится к любому соединению и/или веществу, которое может быть включено в полипептидную цепь, например, посредством образования одной или более 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 встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой не встречающуюся в природе 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 пептидах природного происхождения. «Нестандартная аминокислота» относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетическим путем или из природного источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, включая карбокси- и/или аминоконцевую аминокислоту в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, как показано выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована метилированием, амидированием, ацетилированием, пегилированием, гликозилированием, фосфорилированием и/или замещением (например, аминогруппы, карбоновой кислоты, одного или более протонов, и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например, изменить время полужизни в кровотоке полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет соответствующую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту.

**[0017]** *Приблизительно или около.* В контексте данного документа термины «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, включая значение, которое аналогично заявленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в предел  $\pm 10\%$  или менее

в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения). Например, в некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» может охватывать диапазон значений, который находится в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше указанного значения.

**[0018]** *Связанный с.* В контексте данного документа термин «связанный» описывает два события или объекта как «связанные» друг с другом в том смысле, если присутствие, уровень и/или форма одного из них коррелирует с присутствием, уровнем и/или формой другого. Например, конкретный объект (например, полипептид, генетическая сигнатура, метаболит, микроб и т. д.) считается связанным с конкретным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, если его наличие, уровень и/или форма коррелируют с частотой и/или восприимчивостью заболевания, нарушения или патологического состояния (например, среди соответствующей популяции). В некоторых вариантах осуществления два или более объекта физически «связаны» друг с другом, если они взаимодействуют, напрямую или опосредовано, так что они находятся и/или остаются в физической близости друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два или более объекта, которые физически связаны друг с другом, ковалентно связаны друг с другом; в некоторых вариантах осуществления два или более объекта, которые физически связаны друг с другом, не связаны друг с другом ковалентной связью, а связаны нековалентно, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

**[0019]** *Биологически активный.* В контексте данного документа термин «биологически активный» относится к биологическому эффекту или результату, достигаемому с помощью средства или объекта, представляющего интерес. Например, в некоторых вариантах осуществления специфическое связывающее взаимодействие является биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления модуляция (например, индукция, усиление или ингибирование) биологического пути или события является биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления наличие или степень биологической активности оценивают путем обнаружения прямого или опосредованного продукта, образующегося в результате биологического пути или события, представляющего интерес.

**[0020]** *Характерная часть.* В контексте данного документа термин «характерная часть» в самом широком смысле относится к части вещества, присутствие (или отсутствие) которой коррелирует с присутствием (или отсутствием) определенной характеристики,

характерного признака или активности вещества. В некоторых вариантах осуществления характерная часть вещества представляет собой часть, которая обнаруживается в данном веществе и в родственных веществах, которые имеют общую характеристику, характерный признак или активность, но не в веществах, которые не имеют общей характеристики, характерного признака или активности. В некоторых вариантах осуществления характерная часть имеет по меньшей мере одну общую функциональную характеристику с интактным веществом. Например, в некоторых вариантах осуществления «характерная часть» белка или полипептида представляет собой часть, которая содержит непрерывный участок аминокислот или ряд непрерывных участков аминокислот, которые вместе являются характерными для белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый такой непрерывный участок, как правило, содержит по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 50 или более аминокислот. В целом, характерная часть вещества (*например*, белка, антитела и *т.д.*) представляет собой часть, которая, в дополнение к последовательности и/или структурной идентичности, указанной выше, имеет по меньшей мере одну функциональную характеристику с соответствующим интактным веществом. В некоторых вариантах осуществления характерная часть может быть биологически активной.

**[0021]** *Характерная последовательность.* В контексте данного документа термин «характерная последовательность» представляет собой последовательность, которая обнаруживается у всех членов семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, и поэтому может использоваться специалистами в данной области для определения членов семейства.

**[0022]** *Элемент характерной последовательности.* В контексте данного документа фраза «элемент характерной последовательности» относится к элементу последовательности, обнаруживаемому в полимере (*например*, в полипептиде или нуклеиновой кислоте), который представляет собой характерную часть этого полимера. В некоторых вариантах осуществления присутствие характерного элемента последовательности коррелирует с наличием или уровнем определенной активности или свойства полимера. В некоторых вариантах осуществления присутствие (или отсутствие) характерного элемента последовательности определяет конкретный полимер как член (или не член) конкретного семейства или группы таких полимеров. Характерный элемент последовательности обычно включает в себя по меньшей мере два мономера (*например*, аминокислоты или нуклеотиды). В некоторых вариантах осуществления элемент характерной последовательности включает в себя 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*, смежно связанных мономеров). В некоторых вариантах осуществления элемент характерной

последовательности включает в себя по меньшей мере первый и второй участки смежных мономеров, разделенных одной или более спейсерными областями, длина которых может варьироваться или не варьироваться между полимерами, имеющими общий элемент последовательности.

**[0023] Комбинированная терапия.** В контексте данного документа термин «комбинированная терапия» относится к тем ситуациям, в которых субъект одновременно подвергается воздействию двух или более терапевтических схем (например, двух или более лекарственных средств). В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены одновременно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены последовательно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены согласно перекрывающимся схемам дозирования.

**[0024] Сопоставимый.** В контексте данного документа термин «сопоставимый» относится к двум или более средствам, объектам, ситуациям, наборам условий, субъектам, популяциям и т.д., которые могут быть не идентичными друг другу, но являются достаточно сходными для проведения сравнения между ними таким образом, чтобы специалисту в данной области техники было понятно, что выводы могут быть обоснованно сделаны на основе наблюдаемых различий или сходств. В некоторых вариантах осуществления сопоставимые наборы средств, объекты, ситуации, наборы условий, субъекты, популяции и т.д. характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим количеством разнообразных признаков. Специалистам в данной области техники будет понятно, исходя из контекста, какая степень идентичности требуется в любом данном случае, чтобы два или более таких средств, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д. считались сопоставимыми. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что наборы средств, объекты, ситуации, наборы условий, субъекты, популяции и т.д. являются сопоставимыми друг с другом, если они характеризуются достаточным количеством и типом по существу идентичных признаков, чтобы гарантировать разумный вывод о том, что различия в полученных результатах или явлениях, наблюдаемые при различных наборах обстоятельств, стимулах, средствах, субъектах, ситуациях, наборах условий, субъектах, популяциях и т.д., вызваны или указывают на различия в тех признаках, которые различаются.

**[0025] Конструкция.** В контексте данного документа термин «конструкция» относится к композиции, включающей полинуклеотид, способный нести по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления конструкция может представлять собой плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому (например, искусственную хромосому человека (НАС)), искусственную хромосому

дрожжей (YAC), искусственную хромосому бактерий (BAC) или искусственную хромосому на основе P1 (PAC)) или вирусную конструкцию и любые плазмиды для технологии Gateway®. Конструкция может, например, содержать достаточное количество цис-действующих элементов экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой примата-хозяина или в системе экспрессии *in vitro*. Конструкция может включать любой генетический элемент (например, плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому, вирусную конструкцию и т. д.), который способен реплицироваться, когда он связан с соответствующими элементами контроля. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления «конструкция» может включать конструкцию для клонирования и/или экспрессии и/или вирусную конструкцию (например, конструкцию аденоассоциированного вируса (AAV), конструкцию аденовируса, конструкцию лентивируса или конструкцию ретровируса).

**[0026] Консервативный.** В контексте данного документа термин «консервативный» относится к случаям, описывающим консервативную аминокислотную замену, включая замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи со сходными химическими свойствами (*например*, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства представляющего интерес белка, например, способность рецептора связываться с лигандом. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: алифатические боковые цепи, такие как глицин (Gly, G), аланин (Ala, A), валин (Val, V), лейцин (Leu, L) и изолейцин (Ile, I); алифатически-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 консервативная аминокислотная замена может представлять собой замену любого нативного остатка в белке аланином, как это применяется, например, в аланин-сканирующем мутагенезе. В некоторых вариантах осуществления выполняется консервативная замена, которая имеет положительное значение в матрице

логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet, GH et al., 1992, Science 256: 1443-1445, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой умеренно консервативную замену, причем замена имеет неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Специалистам в данной области техники будет понятно, что изменение (например, замена, добавление, удаление и т.д.) аминокислот, которые не являются консервативными между одним и тем же белком из разных видов, с меньшей вероятностью окажет влияние на функцию белка, и следовательно, эти аминокислоты должны быть отобраны для мутации. Аминокислоты, которые являются консервативными между одними и теми же белками разных видов, не следует изменять (например, удалять, добавлять, заменять и т.д.), поскольку такие мутации с большей вероятностью приведут к изменению функции белка.

<b>КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ</b>		
<b>Для аминокислоты</b>	<b>Код</b>	<b>Заменить на</b>
Аланин	A	D-ala, Gly, Aib, $\beta$ -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, $\beta$ -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,

		Транс-3,4 или 5-фенилпролин, AdaA, AdaG, цис-3,4 или 5-фенилпролин, Вра, D-Вра
Пролин	P	D-Pro, L-I-тиоазолидин-4-карбоновая кислота, D-или-L-1-оксазолидин-4-карбоновая кислота (Kauer, патент США № 4 511 390)
Серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
Треонин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-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

**[0027] *Контроль.*** В контексте данного документа термин «контроль» относится к понимаемому в данной области техники значению «контроль», являющемуся стандартом, с которым сравниваются результаты. Как правило, контроли используются для повышения целостности в экспериментах путем выделения переменных с целью выведения заключений о данных переменных. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой реакцию или анализ, который проводится одновременно с тестовой реакцией или анализом для получения компаратор. Например, в одном эксперименте применяется «тест» (т. е. проверяемая переменная). Во втором эксперименте, «контрольном», проверяемая переменная не применяется. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исторический контроль (например, тест или анализ, выполненные ранее, или количества или результат, которые ранее известны). В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой или содержит напечатанную или иным образом сохраненную запись. В некоторых вариантах осуществления контроль является положительным контролем. В некоторых вариантах осуществления контроль является отрицательным контролем.

**[0028] *Определение, измерение, оценивание, количественное определение и анализирование.*** В контексте данного документа термины «определение», «измерение», «оценивание», «количественное определение» и «анализирование» могут применяться взаимозаменяем и относятся к любой форме измерения, и включают определение, присутствует ли элемент или нет. Такие термины включают оба из количественного и/или качественного определений. Оценка может быть относительной или абсолютной. Например, термин «анализ на наличие» может обозначать определение количества присутствующего вещества и/или определение того, присутствует оно или отсутствует.

**[0029] Сконструированный.** В целом, в контексте данного документа термин «сконструированный» относится к аспекту, связанному с манипуляциями со стороны человека. Например, клетка или организм считаются «сконструированными», если с ними проводили манипуляции таким образом, что была изменена их генетическая информация (*например*, был введен новый генетический материал, который ранее отсутствовал, например, путем трансформации, спаривания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукция или другого механизма, или ранее присутствующий генетический материал был изменен или удален, например, путем замены или делеционной мутации или с помощью протоколов спаривания). Как обычно применяется на практике и понятно специалистам в данной области, потомство сконструированного полинуклеотида или клетки обычно все еще называют «сконструированным», даже если фактическое вмешательство выполняли на предшествующем объекте.

**[0030] Вспомогательное вещество.** В контексте данного документа термин «вспомогательное вещество» относится к неактивному (*например*, нетерапевтическому) агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах осуществления подходящие фармацевтические вспомогательные вещества могут включать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

**[0031] Экспрессия.** В контексте данного документа термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к образованию любого генного продукта (*например*, транскрипта, *например*, мРНК, *например*, полипептида и т.д.) из последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой транскрипт. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты включает одно или более из следующего: (1) продукции матрицы РНК из последовательности ДНК (*например*, путем транскрипции); (2) процессинга транскрипта РНК (*например*, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп-структуры и/или образования 3'-концевой структуры); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

**[0032] Функциональный.** В контексте данного документа термин «функциональный» описывает что-то, что существует в форме, в которой оно проявляет свойство и/или активность, которыми оно характеризуется. Например, в некоторых вариантах

осуществления «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется. В некоторых таких вариантах осуществления функциональная биологическая молекула характеризуется по сравнению с другой биологической молекулой, которая является нефункциональной, в том смысле, что «нефункциональная» версия не проявляет того же или эквивалентного свойства и/или активности, что и «функциональная» молекула. Биологическая молекула может иметь одну функцию, две функции (т. е. бифункциональная) или много функций (т. е. многофункциональная).

**[0033]** *Ген.* В контексте данного документа термин «ген» относится к последовательности ДНК, которая кодирует генный продукт (например, продукт РНК, например, продукт полипептида). В некоторых вариантах осуществления ген включает кодирующую последовательность (то есть последовательность, которая кодирует конкретный продукт). В некоторых вариантах ген включает некодирующую последовательность. В некоторых конкретных вариантах осуществления ген может включать как кодирующую (например, экзонную), так и некодирующую (например, интронную) последовательность. В некоторых вариантах ген может включать одну или несколько регуляторных последовательностей (например, промоторов, энхансеров и т. д.) и/или интронных последовательностей, которые, например, могут контролировать или влиять на один или несколько аспектов экспрессии генов (например, экспрессия, специфичная для клеточного типа, индуцибельная экспрессия и т. д.). В контексте данного документа термин «ген» обычно относится к части нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид или его фрагмент; термин может необязательно включать регуляторные последовательности, что будет понятно из контекста специалистам в данной области техники. Это определение не предназначено для исключения применения термина «ген» к не кодирующим белок единицам экспрессии, а скорее для пояснения того, что в большинстве случаев термин, используемый в данном этом документе, относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным, например, вариант гена может кодировать полипептид, который не функционирует таким же образом или вообще не функционирует по сравнению с геном дикого типа. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать транскрипт, который в некоторых вариантах осуществления может проявлять токсичность выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным и/или может проявлять токсичность выше

порогового уровня.

**[0034] Потеря слуха.** В контексте данного документа термин «потеря слуха» может использоваться для обозначения частичной или полной 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 возникнуть в результате заболевания или травмы (например, физической травмы, лечения одним или более средствами, приводящими к потере слуха, и т. д.). В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть обусловлена одной или более известными генетическими причинами и/или синдромами. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может иметь неизвестную этиологию. В некоторых вариантах осуществления степень потери слуха может быть снижена или не снижена с помощью слуховых аппаратов или других видов лечения.

**[0035] Гетерологичный.** В контексте данного документа термин «гетерологичный» может использоваться в отношении одной или более областей конкретной молекулы по сравнению с другой областью и/или другой молекулой. Например, в некоторых вариантах осуществления гетерологичные полипептидные домены относятся к тому факту, что полипептидные домены в природе не встречаются вместе (например, в одном и том же полипептиде). Например, в слитых белках, созданных человеком, полипептидный домен из одного полипептида может быть слит с полипептидным доменом из другого полипептида. В таком слитом белке два полипептидных домена будут считаться «гетерологичными» по отношению друг к другу, поскольку в природе они не встречаются вместе.

**[0036] Идентичность.** В контексте данного документа термин «идентичность» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновых кислот (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «по существу идентичными» друг другу, если их последовательности являются по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичными. Например, вычисление процентной идентичности двух полинуклеотидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (*например*, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания и

неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью 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. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой), что и соответствующее положение во второй последовательности, то две молекулы (т. е. первая и вторая) являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в двух сравниваемых последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Мейерса и Миллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), который был включен в программу ALIGN (версия 2,0). В некоторых вариантах осуществления при сравнениях последовательностей нуклеиновых кислот, выполненных с помощью программы ALIGN, используют таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4.

**[0037]** *Улучшать, увеличивать, ингибировать или уменьшать.* В контексте данного документа термины «улучшать», «увеличивать», «ингибировать» или «уменьшать» или их грамматические эквиваленты указывают на значения, которые относятся к измерению на исходном уровне или другому эталонному измерению. В некоторых вариантах осуществления значение статистически значимо отличается от измерения на исходном уровне или другого эталонного измерения. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может представлять собой или включать в себя измерение в конкретной системе (например, у одного человека) в других сопоставимых условиях при отсутствии (например, до и/или после) конкретного агента или лечения, или в присутствии соответствующего сопоставимого эталонного агента. В некоторых вариантах осуществления подходящее эталонное измерение может представлять собой или включать в себя измерение в сопоставимой системе, о которой известно или ожидается, что она будет реагировать определенным образом в присутствии соответствующего агента или лечения. В некоторых вариантах осуществления подходящей ссылкой является

отрицательная ссылка; в некоторых вариантах осуществления подходящей ссылкой является положительная ссылка.

**[0038]** *Нуклеиновая кислота.* В контексте данного документа термин "нуклеиновая кислота" в самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или вещество, которое входит или может быть включено в олигонуклеотидную цепь 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 олигонуклеотидной цепи, 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 более остатков естественной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой, содержит или состоит из одного или более аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что он не использует фосфодиэфирный каркас. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет одну или несколько фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, включает или состоит из одного или более природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, включает или состоит из одного или более нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C-5 пропинилцитидина, C-5 пропинил-уридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинил-уридина, C5-пропинил-цитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-аминоадаина, 7-дезагуанозина, 8-оксаденозина, 8-оксогуанозина, 0(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота включает один или более модифицированных сахаров (например, 2'-фторибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу,

арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми в естественных нуклеиновых кислотах. 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» включает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают путем одного или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения 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 полипептид, или являющуюся комплементарной последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота обладает ферментативной активностью.

**[0039] Функционально связанный.** В контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к взаимному расположению, в котором описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предпологаемым для них образом. Элемент контроля, «функционально связанный» с функциональным элементом, связан таким образом, что выражение и/или активность функционального элемента достигается в условиях, совместимых с элементом контроля. В некоторых вариантах осуществления «функционально связанные» элементы контроля расположены смежно (например, ковалентно связаны) с представляющими интерес элементами кодирования; в некоторых вариантах осуществления элементы контроля действуют в направлении, противоположном представляющему интерес функциональному элементу, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления «функционально соединенный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью

нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления функциональная связь может включать транскрипционный контроль. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально соединенные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

**[0040]** *Фармацевтическая композиция.* В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активный агент составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активный агент присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении соответствующей совокупности организмов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть специально составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы, например, для введения, например, инъекционная композиция, которая представляет собой, например, водный или неводный раствор, или суспензию, или жидкую каплю, предназначенную для введения в ушной канал. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для введения путем инъекции либо в определенный орган или участок, например, непосредственно в ухо, либо системно, например, внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой или включать жидкую лекарственную форму для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, болюсы, порошки, гранулы, пасты, капсулы, порошки и т.д. В некоторых вариантах осуществления активный агент может представлять собой или включать выделенное, очищенное или чистое соединение.

**[0041]** *Фармацевтически приемлемый.* В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый», который, например, может быть использован в отношении носителя, разбавителя или вспомогательного вещества, используемого для составления фармацевтической композиции, как раскрыто в данном документе, означает, что носитель, разбавитель или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами композиции и не оказывают вредного воздействия на получателя

композиции.

**[0042] Фармацевтически приемлемый носитель.** В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или растворитель, инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиториев; 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 агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; рН-забуференные растворы; сложные полиэферы, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

**[0043] Полиаденилирование.** В контексте данного документа термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 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), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост может быть добавлен к транскриптам, которые содержат конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования или «последовательность поли(А)». Поли(А)-хвост и связанные с ним белки способствуют защите мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование может влиять на терминацию транскрипции, экспорт мРНК из ядра и трансляцию. Как правило, полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции

ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК может расщепляться действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления может характеризоваться присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки могут быть добавлены к свободному 3'-концу на участке расщепления. В контексте данного документа термин «последовательность поли(А)» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

**[0044]** *Полипептид*. В контексте данного документа 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 сконструирована таким образом, что она сконструирована и/или продуцирована посредством действий человека. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать или включать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или и то и другое. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать одну или более боковых групп или другие модификации, например, модификацию или присоединение к одной или более боковым цепям аминокислот, на N-конце полипептида, на C-конце полипептида или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие боковые группы или модификации могут представлять собой ацетилирование, амидирование, липидирование, метилирование, пегилирование и т.д., 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 техники. В некоторых вариантах осуществления применимые модификации могут представлять собой или включать, например, терминальное ацетилирование, амидирование, метилирование и т.д. В некоторых вариантах осуществления белок может содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин «пептид» обычно используется для обозначения полипептида, имеющего длину менее около 100 аминокислот, менее около 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 характерные части.

**[0045] Полинуклеотид.** В контексте данного документа 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 более остатков естественной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления аналог полинуклеотида отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что он не использует фосфодиэфирный каркас. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет одну или более фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, включает или состоит из одного или более природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, включает или состоит из одного или более нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C-5 пропинилцитидина, C-5 пропинил-уридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинил-уридина, C5-пропинил-цитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-аминоазадина, 7-деазагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, 0(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид включает один или более модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксиррибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми в естественных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид получают путем одного или нескольких выделений из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (in vivo или in vitro), размножения 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 являющуюся комплементарной последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает ферментативной активностью.

**[0046]** *Белок.* В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду (т. е. цепочке из по меньшей мере двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать фрагменты, отличные от аминокислот (например, могут представлять собой гликопротеины, протеогликаны и т. д.), и/или могут быть обработаны или модифицированы иным образом. Специалистам в данной области техники будет понятно, что «белок» может представлять собой полную полипептидную цепь, продуцируемую клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее), или может представлять собой ее характерную часть. Специалистам в данной области техники будет понятно, что белок иногда может включать более одной полипептидной цепи, например, связанной одной или более дисульфидными связями или связанной другими способами.

**[0047]** *Рекомбинантный.* В контексте данного документа термин «рекомбинантный» предназначен для обозначения полипептидов, которые разработаны, сконструированы, получены, экспрессированы, созданы, произведены и/или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как полипептиды, экспрессируемые с использованием рекомбинантной конструкции для экспрессии, трансфицированной в клетку-хозяин; полипептидов, выделенных из рекомбинантной комбинаторной библиотеки полипептидов человека; полипептидов, выделенных из животного (например, мыши, кролика, овцы, рыбы и т. д.), которое является трансгенным или подвергалось иным манипуляциям для экспрессии гена или генов, или компонентов генов, которые кодируют и/или направляют экспрессию полипептида или одного или более их компонентов, частей, элементов или доменов; и/или полипептидов, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг или лигирование выбранных элементов последовательности нуклеиновых кислот друг с другом, химический синтез выбранных элементов последовательности и/или получение иным образом нуклеиновой кислоты, которая кодирует и/или направляет экспрессию полипептида или

одного или более из его компонента(ов), части(ей), элемента(ов) или домена(ов). В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности сконструированы *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более 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, из зародышевой линии представляющего интерес исходного организма (например, человека, мыши и т. д.).

**[0048]** *Эталон*. В контексте данного документа термин «эталон» описывает стандарт или контроль, относительно которого проводится сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления представляющие интерес агент, животное, индивида, популяцию, образец, последовательность или значение сравнивают с эталонными или контрольными агентом, животным, индивидом, популяцией, образцом, последовательностью или значением. В некоторых вариантах осуществления исследование и/или определение для эталона или контроля проводят практически одновременно с представляющим интерес исследованием или определением. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль представляет собой ретроспективный эталон или контроль, необязательно, отображенный на материальном носителе. Как правило, как очевидно для специалистов в данной области, определение или получение характеристик эталона или контроля проводят в условиях или при обстоятельствах, сравнимых с теми, для которых проводится оценка. Для специалистов в данной области техники очевиден факт присутствия достаточного сходства для подтверждения достоверности и/или сравнения с конкретным возможным эталоном или контролем. В некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой эталон отрицательного контроля; в некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой эталон положительного контроля.

**[0049]** *Регуляторный элемент*. В контексте данного документа термин «регуляторный элемент» или «регуляторная последовательность» относится к некодирующим областям ДНК, которые каким-то образом регулируют экспрессию одного или более 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 указанного регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент нарушает или усиливает транскрипцию одного или более генов. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в *cis*-положении относительно

регулируемого гена. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в транс-положении 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 эта последовательность может представлять собой энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию генного продукта.

**[0050]** *Образец.* В контексте данного документа термин «образец» обычно относится к аликвоте материала, полученного или полученного из представляющего интерес источника. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой биологический источник или природный источник. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник может представлять собой или включать клетку или организм, такой как микроб (например, вирус), растение или животное (*например*, человека). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой или содержит биологическую ткань или жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или жидкость может представлять собой или включать амниотическую жидкость, водянистую влагу, асцит, желчь, костный мозг, кровь, грудное молоко, спинномозговую жидкость, ушную серу, хилус, химус, эякулят, эндолимфу, экссудат, фекалии, желудочную кислоту, желудочный сок, лимфу, слизь, перикардальную жидкость, перилимфу, перитонеальную жидкость, плевральную 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 компоненты. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может представлять собой или включать внутриклеточную жидкость, внеклеточную жидкость, внутрисосудистую жидкость (плазму крови), интерстициальную жидкость, лимфатическую жидкость и/или трансцеллюлярную жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может представлять собой растительный экссудат или содержать его. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или образец могут быть получены, 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, бронхиоальвеолярного, протокового, назального, глазного, орального, маточного, вагинального или другого промывания или лаважа). В некоторых вариантах осуществления

биологический образец представляет собой или включает клетки, полученные от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец», полученный непосредственно из представляющего интерес источника любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления, как следует из контекста, термин «образец» относится к препарату, полученному путем обработки (*например*, путем удаления одного или более компонентов и/или добавления одного или более агентов) исходного образца. Например, фильтрация с применением полупроницаемой мембраны. Такой «обработанный образец» может содержать, например, нуклеиновые кислоты или белки, выделенные из образца или полученные путем применения к первичному образцу одного или более методов, таких как амплификация или обратная транскрипция нуклеиновой кислоты, выделение и/или очистка некоторых компонентов и т. д.

**[0051]** *Субъект.* В контексте данного документа термин «субъект» относится к организму, как правило, млекопитающему (например, человеку, в некоторых вариантах осуществления, включая пренатальные человеческие формы). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает соответствующим заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления субъект восприимчив к заболеванию, нарушению или состоянию. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется один или более симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует один или более симптомов или одну или более характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой лицо с одной или более характеристиками, характеризующими предрасположенность или риск развития заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент. В некоторых вариантах осуществления субъектом является индивидуум, которому поставлен диагноз и/или назначена терапия.

**[0052]** *По существу.* В контексте данного документа термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень, или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Квалифицированный специалист в данной области техники поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достигают или исключают абсолютный результат. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

**[0053]** *Лечение.* В контексте данного документа термин «лечение» (также «лечить» или

«процесс лечения») относится к любому введению терапии, которая частично или полностью облегчает, ослабляет, улучшает, подавляет, задерживает начало, снижает тяжесть и/или уменьшает частоту появления одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение может проводиться у субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния, и/или субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния. Альтернативно или дополнительно, такое лечение может проводиться у субъекта, у которого проявляется один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться у субъекта, которому был поставлен диагноз соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться у субъекта, о котором известно, что у него имеется один или более факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития указанного заболевания, нарушения и/или состояния.

**[0054]** *Вариант.* В контексте данного документа термин «вариант» относится к версии чего-либо, например, последовательности гена, которая каким-то образом отличается от другой версии. Для определения того, является ли что-то вариантом, обычно выбирается эталонная версия, а вариант отличается от этой эталонной версии. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь такой же или другой (например, повышенный или пониженный) уровень активности или функциональности, чем последовательность дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант может иметь улучшенную функциональность по сравнению с последовательностью дикого типа, если он, например, является оптимизированным по кодонам для противостояния деградации, например, под действием ингибирующей нуклеиновой кислоты, например, микроРНК. Такой вариант упоминается в данном документе как вариант с приобретением функции. В некоторых вариантах осуществления вариант характеризуется снижением или устранением активности или функциональности или изменением активности, что приводит к отрицательному результату (например, повышение электрической активности, приводящее к хронической деполяризации, что приводит к гибели клеток). Такой вариант упоминается в данном документе как вариант с потерей функции. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательность гена CLRN1 представляет собой последовательность дикого типа, которая кодирует функциональный белок и существует у большинства представителей видов с геномами, содержащими ген CLRN1. В некоторых таких вариантах осуществления вариант с приобретением функции может представлять собой

последовательность гена CLRN1, которая содержит одно или более нуклеотидных отличий по сравнению с последовательностью гена CLRN1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант с приобретением функции представляет собой оптимизированную по кодонам последовательность, которая кодирует транскрипт или полипептид, который может иметь улучшенные свойства (например, меньшую восприимчивость к деградации, например, меньшую восприимчивость к деградации, опосредованной микроРНК), чем соответствующий дикий тип (например, не оптимизированная по кодонам) версия. В некоторых вариантах осуществления вариант с потерей функции имеет одно или более изменений, которые приводят к тому, что транскрипт или полипептид является каким-либо образом дефектным (например, сниженная функция, нефункционирование) по сравнению с транскриптом и/или полипептидом дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления мутация в последовательности CLRN1 приводит к нефункциональному или иным образом дефектному белку кларину 1.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0055]** На фиг. 1А изображен упрощенный эндогенный геном AAV; на фиг. 1В изображена упрощенная конструкция рекомбинантного AAV (rAAV), способная экспрессировать ген CLRN1.

**[0056]** На фиг. 2 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0057]** На фиг. 3 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0058]** На фиг. 4 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0059]** На фиг. 5 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0060]** На фиг. 6 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0061]** На фиг. 7 изображена иллюстративная конструкция rAAV, содержащая ген CLRN1.

**[0062]** На фиг. 8 показана примерная схема структуры сетчатки глаза.

**[0063]** На фиг. 9 представлено схематическое изображение репрезентативной анатомии человеческого уха.

**[0064]** На фиг. 10 представлено схематическое изображение внутреннего уха, показывающее непрерывность жидкости перилимфы между вестибулярной системой слева

и улиткой (барабанная лестница, вестибулярная лестница) справа. **На фиг. 10А** представлена схему спиральной улитки. Количество показанных поворотов улитки является репрезентативным для внутреннего уха мыши. **На фиг. 10В** представлена схема, показывающая поперечное сечение улитки. На схеме барабанная лестница и вестибулярная лестница заполнены перилимфой, а средняя лестница заполнена эндолимфой (Talaei 2019, полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0065]** **На фиг. 11** представлено схематическое изображение описанного в данном документе способа введения. **На фиг. 11А** включено изображение устройства доставки, как описано в настоящем документе (см., например, WO 2021/242926, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки). Устройство доставки, как показано, предназначено для интракохлеарного введения вводимой жидкости через мембрану круглого окна со стопором для определения глубины введения. **На фиг. 11В** включено изображения, показывающие ожидаемый поток вводимой жидкости через барабанную лестницу в вестибулярную лестницу (через сообщение в геликотреме на вершине улитки), а затем из улитки через вентиляционное отверстие, расположенное в подножке стремени устройства доставки в пределах овального окна. (Talei 2019, которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0066]** **На фиг. 12** включено репрезентативные флуоресцентные изображения, изображающие кохлеарную трансдукцию *in vivo* встречающихся в природе серотипов AAV и варианта Anc80 AAV у новорожденных мышей посредством доставки через мембрану круглого окна. Мышам (P1) вводили различные капсиды AAV (AAV1, AAV2, AAV8, AAV6 [не показаны] и AAV Anc80), содержащие конструкцию, кодирующую усиленный GFP (eGFP). Для маркировки актина использовали фаллоидин. Количественная оценка eGFP-позитивных внутренних волосковых клеток (ИНС) и наружных волосковых клеток (ОНС) показала эффективность трансдукции примерно от 90 до 100% от основания к верхушке после доставки rAAV Anc80, содержащей конструкцию, кодирующую усиленный GFP (rAAV Anc80-eGFP). (Landegger 2017, которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0067]** **На фиг. 13** включено репрезентативные флуоресцентные изображения, изображающие вестибулярную трансдукцию частиц rAAV Anc80 *in vivo* у новорожденных мышей посредством доставки через мембрану круглого окна. Мышам (P1) вводили AAV Anc80-eGFP. Окрашивание фаллоидином использовали для мечения актина. Трансдукцию наблюдали в волосковых клетках маточки как типа I, так и типа II на **фиг. 13А**, а также клетки кристаты полукружного канала на **фиг. 13В** (Landegger 2017, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0068]** На **фиг. 14** включены репрезентативные флуоресцентные изображения, изображающие трансдукцию частиц гAAV Anc80 в улитку *in vivo* у взрослых мышей посредством доставки в задний полукружный канал. Мышам (возраст 7 недель) вводили частицы гAAV Anc80-eGFP. На **фиг. 14А** включено изображение с малым увеличением срединно-медиолярного среза инъецированной улитки, показывающее сигнал eGFP в ИНС, обозначаемом как (I), ОНС, обозначаемом как (O), спиральном лимбе, обозначаемом как (SL), мембране Рейсснера, обозначаемой как (RM), и спиральном ганглии, обозначаемом как (SG). На **фиг. 14В1** и **фиг. 14В2** включены изображения Кортиева органа с большим увеличением из апикальной (**фиг. 14В1**) и средней (**фиг. 14В2**) областей улитки. Количественная оценка eGFP-позитивных клеток показала, что примерно 100% ИНС трансдуцировались, тогда как трансдукция ОНС уменьшалась от верхушки к основанию. На **фиг. 14С** представлено изображение с малым увеличением, показывающее, что сигнал eGFP был обнаружен в подмножестве клеток (нейронах и сателлитных глиальных клетках) в спиральном ганглии (Suzuki 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0069]** На **фиг. 15** включены репрезентативные флуоресцентные изображения, изображающие вестибулярную трансдукцию *in-vivo* гAAV Anc80-eGFP у взрослых мышей посредством доставки в задний полукружный канал. Мышам (возраст 7 недель) вводили гAAV Anc80-eGFP. На **фиг. 15А1** и **фиг. 15А2**) включен вид сечения преддверия с малым увеличением, показывающий сигнал eGFP как в маточке, так и в мешочке. На **фиг. 15В** и **фиг. 15С** включены виды с большим увеличением срезов вестибулярных концевых органов (**фиг. 15В**: маточка; **фиг. 15С**: ампулярный гребешок), демонстрирующие экспрессию eGFP в поддерживающих клетках и волосковых клетках. Заштрихованные стрелки указывают пример трансдуцированных опорных клеток (волосковые клетки не указаны) (Suzuki 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0070]** На **фиг. 16** включены репрезентативные флуоресцентные изображения, изображающие *in vivo* кохлеарную и вестибулярную трансдукцию встречающегося в природе серотипа AAV2 по сравнению с вариантом гAAV Anc80 у взрослых мышей посредством доставки через мембрану круглого окна с фенестрацией канала. Мышам (в возрасте 4 недель) вводили различные частицы AAV (в данном документе показаны AAV2 и гAAV Anc80; AAV1, AAV8 и AAV9 не показаны), кодирующие eGFP. По сравнению с AAV2 трансдукция, опосредованная гAAV Anc80, показала сопоставимые скорости трансдукции ИНС и ОНС (**фиг. 16А1 по сравнению с фиг. 16А2**), но более широкую трансдукцию клеток спирального ганглия (**фиг. 16В1 по сравнению с фиг. 16В2**) и волосковых клеток мешочка (**фиг. 16С1 по сравнению с фиг. 16С2**: тотальные препараты;

**фиг. 16D1** по сравнению с **фиг. 16D2**: разрезы) (Omichi 2020, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0071]** На **фиг. 17** включен вестерн-блоттинг, показывающий экспрессию белка CLRN1 клетками НЕК с использованием трансдукции типичных конструкций rAAV-CLRN1, описанных в настоящем документе. Линии отмечены вдоль верхней части фигуры, а предсказанные размеры белка отмечены слева от фигуры. Линии, помеченные знаком «+», указывают на обработку PNGase F. Линия 1: предварительно окрашенный набор маркерных белков PageRuler™. Линия 2: нетрансфицированный/отрицательный контроль. Линия 3: нетрансфицированный/отрицательный контроль (+). Линия 4: трансдукция частицей rAAV-CLRN1 дикого типа (wt) с множественностью заражения (MOI)  $6,7 \times 10^4$ . Линия 5: трансдукция частицей rAAV-CLRN1wt (+) с множественностью заражения (MOI)  $6,7 \times 10^4$ . Линия 6: трансдукция частицей rAAV Anc80-CLRN1wt с множественностью заражения (MOI)  $1,3 \times 10^5$ . Линия 7: трансдукция частицей rAAV Anc80-CLRN1wt (+) с множественностью заражения (MOI)  $1,3 \times 10^5$ . Линия 8: трансдукция частицей rAAV Anc80-CLRN1wt с множественностью заражения (MOI)  $2,3 \times 10^5$ . Линия 9: трансдукция частицей rAAV Anc80-CLRN1wt (+) с множественностью заражения (MOI)  $2,3 \times 10^5$ . Линия 10: трансдукция частицей, модифицированной кодоном Anc80-CLRN1 rAAV, с множественностью заражения (MOI)  $2,3 \times 10^5$ . Линия 11: трансдукция частицей rAAV Anc80-CLRN1wt (+) с множественностью заражения (MOI)  $2,3 \times 10^5$ . Полосы также указывают, является ли «iso1» или изоформа А CLRN1 гликозилированной или дегликозилированной.

**[0072]** На **фиг. 18A** представлено графическое изображение экспрессии РНК в эксплантатах улитки после трансдукции эксплантатов улитки новорожденных (P2) мышей дикого типа (WT) частицами rAAV Anc80, содержащими белки кларин 1, как описано в настоящем документе (rAAV Anc80-CLRN1). На **фиг. 18A** представлен анализ экспрессии РНК и демонстрируется экспрессия мРНК, кодирующей CLRN1, в клетках эксплантатов, получающих частицы rAAV Anc80-CLRN1 (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 64). Экспрессия не была обнаружена в эксплантатах, получавших носитель ("ложный"). Результаты указывают на среднюю экспрессию. На **фиг. 18B** представлено флуоресцентное изображение, показывающее экспрессию белка CLRN1 у новорожденных мышей дикого типа.

**[0073]** На **фиг. 19** показан вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

**[0074]** На **фиг. 20** показан вид сбоку подбора изогнутой иглы в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

**[0075]** На **фиг. 21** показан вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

**[0076]** На **фиг. 22** показан вид сбоку подбора изогнутой иглы, соединенной с дистальным концом устройства, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

### **Потеря слуха**

**[0077]** Как правило, ухо можно описать как включающее в себя: наружное ухо, среднее ухо, внутреннее ухо, слуховой (акустический) нерв и систему слуха (которая обрабатывает звук по мере его прохождения от уха к головному мозгу). Помимо обнаружения звука, уши также помогают сохранять равновесие. Таким образом, в некоторых вариантах заболевания внутреннего уха могут вызывать потерю слуха, шум в ушах, головокружение, дисбаланс или их комбинации.

**[0078]** Потеря слуха может быть результатом генетических факторов, факторов окружающей среды или комбинации генетических факторов и факторов окружающей среды. Около половины всех людей, у которых возникает шум в ушах — фантомные шумы в их системе слуха (звон, жужжание, чирканье, гудение или биение) — также имеют повышенную чувствительность или пониженную толерантность к определенным звуковым частотам и диапазонам громкости, известным как гиперacusia. Специалистам в данной области техники известны различные несиндромальные и синдромальные потери слуха (например, синдрома Ашера, DFNB4 и синдром Пендреда, соответственно). Причины нарушения или потери слуха, связанные с воздействием окружающей среды, могут включать, например, некоторые лекарственные препараты, 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 агентами, 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 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, могут быть причиной потери слуха или способствовать ее развитию.

**[0079]** Потеря слуха и/или глухота является одним из наиболее распространенных сенсорных нарушений у человека и могут возникать по многим причинам. В некоторых вариантах осуществления субъект может родиться с потерей слуха или полностью 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, каждый третий человек старше 60 лет и половина людей старше 85 лет сталкиваются с потерей слуха. Приблизительно 1,5 из 1000 детей рождаются с глубокой потерей слуха, а еще от двух до трех из 1000 детей рождаются с частичной потерей слуха (Smith et al., 2005, Lancet 365:879-890, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Более половины этих случаев объясняются генетической составляющей (Di Domenico, et al., 2011, J. Cell. Physiol. 226:2494-2499, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

**[0080]** Лечение потери слуха в настоящее время заключается в усилении слуха при потере слуха от легкой до тяжелой степени и кохлеарной имплантации при потере слуха от тяжелой до глубокой степени (Kral and O'Donoghue, 2010, N. Engl. J. Med. 363:1438-1450, которая полностью включена в данный 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 WO 2020/097372, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления несиндромальная потеря слуха и/или глухота не ассоциируются 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 не являются синдромальными; 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 обозначаются как DFNA, аутосомно-рецессивные формы обозначаются как DFNB, а формы, сцепленные с X-хромосомой, обозначаются как DFN. Каждый тип также нумеруется в том порядке, в котором он был впервые описан. Например, DFNA1 был первым описанным аутосомно-доминантным типом несиндромальной глухоты. От 75 до 80 процентов генетически обусловленных случаев потери слуха и/или глухоты наследуются по аутосомно-рецессивному типу, что означает, что обе копии гена в каждой клетке имеют

мутации (например, при синдроме Ашера). Обычно каждый родитель индивидуума с аутосомно-рецессивной тугоухостью и/или глухотой является носителем одной копии мутировавшего 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 мутировавший 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, встречается менее чем в одном проценте случаев в Соединенных Штатах. Измененная митохондриальная ДНК передается от матери всем ее сыновьям и дочерям. Этот тип глухоты не передается по наследству от отцов. Причины синдромальной и несиндромальной глухоты и/или потери слуха являются сложными. 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 ассоциированы с различными типами глухоты и/или потери слуха, а некоторые гены ассоциируются как с синдромальной, так и с несиндромальной глухотой и/или потерей слуха.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления глухота и/или потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей в слуховом проходе или среднем ухе), нейросенсорной (возникающей во внутреннем ухе или слуховом нерве) или смешанной. В некоторых вариантах осуществления несиндромальная глухота и/или потеря слуха ассоциируется с необратимой потерей слуха, вызванной повреждением структур внутреннего уха (нейросенсорная глухота). В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная тугоухость может быть связана с плохой функцией волосковых клеток. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорные 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 с нормальным порогом, но качество воспринимаемого звука настолько низкое, что речь не может быть понята. Потеря слуха, возникающая в результате изменений в среднем ухе, называется кондуктивной тугоухостью. 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 постречевая. 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 техники, волосковые клетки являются сенсорными рецепторами как слуховой, так и вестибулярной систем ушей позвоночных. Волосковые клетки обнаруживают движение в окружающей среде, а у млекопитающих волосковые клетки расположены в улитке уха, в кортиевоом 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 электрического движения сомы волосковых клеток. Внутренние волосковые клетки преобразуют колебания улитковой жидкости в электрические сигналы, которые слуховой нерв передает в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления волосковые клетки могут быть аномальными при рождении или поврежденными в течение жизни человека. В некоторых вариантах осуществления наружные волосковые клетки способны к регенерации. В некоторых вариантах осуществления внутренние волосковые клетки не способны к регенерации после перенесенной болезни или травмы. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная тугоухость обусловлена аномалиями волосковых клеток.

**[0084]** Как известно специалистам в данной области техники, волосковые клетки не встречаются изолированно, и их функция поддерживается широким спектром клеток, которые в совокупности можно назвать поддерживающими клетками. Поддерживающие клетки могут выполнять многочисленные функции и включать ряд типов клеток, включая, помимо прочего, клетки Генсена, клетки Дейтерса, столбовые клетки, клетки Клавдия, внутренние фаланговые клетки и пограничные клетки. В некоторых вариантах осуществления нейросенсорная тугоухость обусловлена аномалиями поддерживающих клетках. В некоторых вариантах осуществления поддерживающие клетки могут быть

аномальными при рождении или поврежденными в течение жизни человека. В некоторых вариантах осуществления поддерживающие клетки способны к регенерации. В некоторых вариантах осуществления определенные поддерживающие клетки могут быть неспособны к регенерации.

### **Потеря зрения**

**[0085]** Глаза — это органы зрительной системы, которые обеспечивают животных зрением, принимают и обрабатывают визуальные детали, а также обеспечивают несколько функций фотореакции, не зависящих от зрения. Как правило, глаза обнаруживают и преобразуют свет в электрохимические импульсы в нейронах. У высших организмов, таких как млекопитающие, глаз представляет собой сложную оптическую систему, которая собирает свет из окружающей среды, регулирует его интенсивность через диафрагму, проталкивает его через регулируемый набор линз для формирования изображения, преобразует это изображение в набор электрических сигналов и передает эти сигналы в мозг через сложные нервные пути, которые соединяют глаз через зрительный нерв со зрительной корой и другими областями мозга. Анатомия глаза обычно включает роговицу, зрачок, радужную оболочку, хрусталик, переднюю камеру, заднюю камеру, слезную жидкость, лимб, цилиарную мышцу, поддерживающую связку, камеру стекловидного тела, склеру, сосудистую оболочку, сетчатку, желтое пятно/центральную ямку, зрительный нерв и слепое пятно.

**[0086]** Потеря зрения может быть результатом генетических факторов, факторов окружающей среды или комбинации генетических факторов и факторов окружающей среды. Потеря зрения — это любое снижение способности видеть, включая нечеткость зрения, затуманенное зрение, двоение в глазах, слепые пятна, плохое ночное зрение и потерю периферического зрения (туннельное зрение). Потеря зрения может затронуть один или оба глаза, она может происходить постепенно или внезапно, быть частичной или полной. Причины нарушения или потери зрения, связанные с воздействием окружающей среды, могут включать, например, некоторые лекарственные препараты, определенные инфекции до или после рождения и/или воздействие физического контакта объектов с глазом. В некоторых вариантах осуществления внутренние аномалии, такие как врожденные мутации генов, играющих важную роль в анатомии или физиологии глаза, или генетические или анатомические изменения в поддерживающих клетках и/или клетках глаза, могут быть причиной потери слуха или способствовать ее развитию.

**[0087]** Потеря зрения является одним типом сенсорных нарушений у человека и может возникать по многим причинам. В некоторых вариантах осуществления субъект может родиться с потерей зрения или полностью без зрения, в то время как другие могут медленно

терять зрение с течением времени. Приблизительно 26,9 миллиона взрослых американцев сообщают о некоторой степени потери зрения, а 7,8 миллиона взрослых американцев в возрасте 65 лет и старше сообщают о значительной потере зрения.

**[0088]** Пигментная дистрофия сетчатки — это генетическое заболевание, которое вызывает потерю зрения из-за ухудшения состояния клеток сетчатки (например, фоторецепторных клеток). Обычно первыми поражаются палочки сетчатки, что приводит к ранней ночной слепоте (никталопии) и постепенной потере периферического зрения. В других случаях происходит ранняя дегенерация колбочек в желтом пятне, что приводит к потере центральной остроты зрения. В некоторых случаях фовеолярное зрение сохраняется, что приводит к «бубликовому зрению»; центральное и периферическое зрение не изменены, но вокруг центральной области существует кольцо, в котором зрение нарушено.

**[0089]** Симптомы пигментной дистрофии сетчатки включают проблемы со зрением в ночное время и снижение периферического зрения (боковое зрение). По мере ухудшения периферического зрения люди могут испытывать «туннельное зрение». Полная слепота возможна, но не часто. Появление симптомов обычно постепенное и часто в детском возрасте. Дистрофия сетчатки обычно наследуется от родителей человека. Задействованы мутации более чем в 50 генах. Основной механизм включает прогрессирующую потерю фоторецепторных клеток палочек в задней части глаза. Обычно за этим следует потеря фоторецепторных клеток колбочек. Диагноз ставится при осмотре сетчатки с обнаружением пятен темного пигмента. Другие вспомогательные тесты могут включать электроретинограмму, тестирование поля зрения или генетическое тестирование (см., например, "Facts About Retinitis Pigmentosa". National Eye Institute. May 2014, retrieved 18 April 2020, содержание которого настоящим включено в настоящий документ в полном объеме).

**[0090]** В настоящее время нет эффективных препаратов для лечения пигментного ретинита. Усилия по решению проблемы могут включать использование средств для слабовидящих, переносного освещения или обучения ориентированию и подвижности. Добавки пальмитата витамина А могут быть полезны для замедления ухудшения. Зрительный протез может быть вариантом для некоторых людей с тяжелыми заболеваниями. По оценкам, пигментная дистрофия сетчатки поражает 1 из 4000 человек (см., например, "Facts About Retinitis Pigmentosa". National Eye Institute. May 2014, retrieved 18 April 2020, содержание которого настоящим полностью включено в настоящий документ, и Openshaw, Amanda (Feb 2008), "Understanding Retinitis Pigmentosa," University of Michigan Kellogg Eye Center. Archived from the original on 2017-08-29, содержание которого настоящим полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

**[0091]** Как известно специалистам в данной области техники, глаз состоит из различных типов клеток. Клетки, расположенные в зрительных нервах, которые соединяют глаза с мозгом, — это клетки, которые передают электрические сигналы в мозг, чтобы мозг мог воспринимать сигналы как изображения. Клетки сетчатки (например, фоторецепторные клетки) расположены в задней части глаза и преобразуют свет в электрические сигналы. Другие клетки включают палочки и колбочки, которые позволяют людям воспринимать цвета и формы. Экспрессия CLRN1 в глазу была идентифицирована в следующих иллюстративных слоях и/или клетках глаза следующим образом:

<b>Экспрессия CLRN1 в глазу (фиг. 8)</b>			
Внутренний ядерный слой (INL), глиальные клетки Мюллера	мышь	мРНК, ИНС	Geller et al., PLoS Genet 2009, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки
Фоторецепторы (PR), синаптические и соединительные реснички	мышь	вестерн-блоттинг, RT-PCR, ИНС	Zallocchi et al., Hear Res 2009, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки
PR и INL	полосатая гирелла	Вестерн-блоттинг	Phillips et al., Gene Expr Patterns 2013, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки
клетки Мюллера	мышь	RNAscope, scRNA	Xu et al., J Pathol 2019, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки

### **Синдром Ашера**

**[0092]** Синдром Ашера представляет собой состояние, которое влияет как на слух, так и на зрение. Синдром Ашера также может повлиять на равновесие. Некоторыми

основными симптомами синдрома Ашера являются глухота или потеря слуха и заболевания глаз, такие как пигментная дистрофия сетчатки.

**[0093]** Глухота или потеря слуха при синдроме Ашера могут быть вызваны аномальным развитием волосковых клеток (клеток звуковых рецепторов) во внутреннем ухе. Дети с синдромом Ашера обычно рождаются с потерей слуха от умеренной до глубокой, в зависимости от типа синдрома Ашера. Реже потеря слуха при синдроме Ашера появляется в подростковом возрасте или позже. Синдром Ашера также может вызвать серьезные проблемы с равновесием из-за аномального развития вестибулярных волосковых клеток, сенсорных клеток, которые обнаруживают гравитацию и движение головы.

**[0094]** Пигментная дистрофия сетчатки первоначально вызывает куриную слепоту и потерю периферического зрения из-за прогрессирующей дегенерации клеток сетчатки, которая представляет собой светочувствительную ткань в задней части глаза и имеет решающее значение для зрения. По мере прогрессирования пигментной дистрофии сетчатки поле зрения сужается до тех пор, пока не останется только центральное зрение — состояние, называемое туннельным зрением. Кисты в желтом пятне и катаракта (помутнение хрусталика) иногда могут вызывать раннее снижение центрального зрения у людей с синдромом Ашера.

**[0095]** Синдром Ашера поражает от 4 до 17 человек на 100 000 человек и составляет около 50 процентов всех случаев наследственной слепоглухоты. Считается, что на это состояние приходится от 3 до 6 процентов всех глухих детей и еще от 3 до 6 процентов слабослышащих детей. (см., например, Boughman, J.A., et al. (1983), "Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations," *Journal of Chronic Diseases*, 36(8), 595–603; Kimberling, W., et al. (2010), "Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children," *Genetics in Medicine*, 12(8), 512–516; Berson, E.L. (1998), "Treatment of retinitis pigmentosa with vitamin A", *Digital Journal of Ophthalmology*, 4(7), описания которых настоящим полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

**[0096]** Синдром Ашера передается по наследству, а это означает, что он передается от родителей к ребенку через гены. Каждый человек наследует две копии гена, по одной от каждого родителя. Иногда гены изменены или мутированы. Мутировавшие гены могут привести к тому, что клетки будут развиваться или вести себя ненормально.

**[0097]** Синдром Ашера наследуется как аутосомно-рецессивное заболевание. «Аутосомный» означает, что мужчины и женщины с одинаковой вероятностью страдают этим расстройством и с одинаковой вероятностью передают его ребенку любого пола. «Рецессивный» означает, что это состояние возникает только тогда, когда ребенок

наследует две копии одного и того же неисправного гена, по одной от каждого родителя. Человек с одним аномальным геном Ашера не страдает заболеванием, но является носителем, у которого есть 50-процентная вероятность передачи аномального гена каждому ребенку.

**[0098]** Диагностика синдрома Ашера включает в себя соответствующие вопросы, касающиеся истории болезни человека и проверки слуха, равновесия и зрения. Ранняя диагностика важна, поскольку она повышает эффективность лечения. Офтальмолог может использовать расширяющие капли для осмотра сетчатки на наличие признаков пигментной дистрофии сетчатки. Тестирование поля зрения измеряет периферическое зрение и может помочь в диагностике синдрома Ашера. Электроретинограмма измеряет электрическую реакцию светочувствительных клеток глаза в сетчатке. Оптическая когерентная томография может быть полезна для оценки макулярных кистозных изменений. Видеонистагмография измеряет произвольные движения глаз, которые могут указывать на проблемы с равновесием. Аудиологическое тестирование проверяет чувствительность слуха в диапазоне частот.

**[0099]** Существует три типа синдрома Ашера: тип I, тип II и тип III. Люди с синдромом Ашера III не рождаются глухими, но испытывают прогрессирующую потерю слуха, и примерно у половины из них возникают проблемы с равновесием. Например, дети с синдромом Ашера типа III имеют нормальный слух при рождении и нормальное или почти нормальное равновесие, которые могут ухудшаться с возрастом. Снижение слуха и зрения варьируется. У детей с синдромом Ашера типа III часто развивается потеря слуха в подростковом возрасте, и в среднем или позднем взрослом возрасте им требуются слуховые аппараты. Куриная слепота также обычно начинается в подростковом возрасте. Слепые пятна появляются от позднего подросткового возраста до начала двадцати лет. Практическая слепота также возникает к среднему возрасту.

**[0100]** Генетическое тестирование может помочь диагностировать синдром Ашера. Например, мутации в гене CLRN1 связаны с синдромом Ашера III. CLRN1 кодирует кларин 1, белок, важный для развития и поддержания внутреннего уха и сетчатки. Однако функция белка и то, как мутации кларина 1 вызывают потерю слуха и зрения, плохо изучены.

**[0101]** В настоящее время не существует лекарства от синдрома Ашера. Лечение включает в себя устранение проблем со слухом, зрением и равновесием. Ранняя диагностика помогает адаптировать образовательные программы с учетом серьезности потери слуха и зрения, а также возраста и способностей ребенка. Услуги по лечению и коммуникации могут включать в себя слуховые аппараты, вспомогательные устройства для прослушивания, кохлеарные имплантаты, звуковую (слуховую) тренировку и/или изучение

американского языка жестов. Обучение самостоятельной жизни может включать обучение ориентации и подвижности при проблемах с равновесием, обучение шрифту Брайля и услуги для слабовидящих.

**[0102]** Согласно результатам долгосрочного клинического исследования, проведенного при поддержке Национального института глаз и Фонда борьбы со слепотой, витамин А может замедлить прогрессирование пигментной дистрофии сетчатки. На основании исследования взрослые с распространенной формой пигментной дистрофии сетчатки могут получить пользу от ежедневной добавки 15 000 МЕ (международных единиц) пальмитатной формы витамина А.

### **CLRN1**

**[0103]** Ген CLRN1 кодирует «кларин 1» (CLRN1), белок, который экспрессируется в волосковых клетках внутреннего уха (например, внутренних волосковых клетках уха, наружных волосковых клетках уха) и сетчатке.

**[0104]** Например, ген CLRN1 кодирует белок, который содержит цитозольный N-конец, множественные спиральные трансмембранные домены и сигнал удерживания мембраны эндоплазматического ретикулума, TKGH, на C-конце. Считается, что CLRN1 необходим для функционирования волосковых и/или глазных клеток и связан с нервной активацией (см., например, Geng et al., “Usher syndrome IIIA gene clarin-1 is essential for hair cell function and associated neural activation” *Hum Mol Genet.* 2009 Aug 1;18(15):2748-60. doi: 10.1093/hmg/ddp210. Epub 2009 May 3, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки; см. также, например, Dinculescu et al., “AAV-mediated Clarin-1 expression in the mouse retina: implications for USH3A gene therapy” *PLoS One.* 2016; 11(2): e0148874, опубликовано в интернете 16 февраля 2016 г., содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

**[0105]** Ген CLRN1 человека расположен на хромосоме 3q25.1. Он содержит по меньшей мере 8 экзонов (называемых экзонами 0, 0b, 1, 1b, 2, 2b, 3a и 3b), охватывающих ~ 47 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) (см., например, Vastinsalo et al. (2011) *Eur J Hum Genet* 19(1): 30-35, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки, номер доступа NCBI NG\_009168.1, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки). Для этого гена было идентифицировано множество вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы (например, см. NCBI Gene ID: 7401, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0106]** Различные мутации в генах CLRN1 были связаны с синдромом Ашера типа III (см., например, синдром Ашера типа IIIA (MIM#606397; Fields et al. (2002) *Am J Hum Genet*

71: 607-617, который включен в его полностью здесь в качестве ссылки и Joensuu et al. (2001) *Am J Hum Genet* 69: 673-684, которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки) и пигментной дистрофии сетчатки (см., например, Khan et al. (2011) *Ophthalmology* 118: 1444-1448, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Мутации, вызывающие синдром Ашера типа III, преимущественно обнаруживаются в экзоне 3 CLRN1. Глухота синдрома Ашера типа III может быть смоделирована путем создания мышей с дефицитом CLRN1 (см., например, Geng et al. (2017) *Sci Rep* 7(1): 13480, который полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки). Иллюстративные мутации CLRN1, связанные с синдромом Ашера типа III, включают: T528G, M120K, M44K, N48K и C40G.

**[0107]** Типичные мутации CLRN1, связанные с пигментной дистрофией сетчатки, включают L154W и P31L (см., например, Khan et al. (2011) *Ophthalmology* 118: 1444-1448, которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0108]** Дополнительные иллюстративные мутации в гене CLRN1, которые были обнаружены у субъектов с потерей слуха, и способы секвенирования нуклеиновой кислоты, кодирующей CLRN1, описаны, например, в Fields et al. (2002) *Am J Hum Genet* 71: 607-617, Joensuu et al. (2001) *Am J Hum Genet* 69: 673-684, Adato et al. (2002) *Europ J Hum Genet* 10: 339-350, Aller et al. (2004), *Clin Genet* 66: 525-529, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Способы обнаружения мутаций в гене хорошо известны в данной области. Неограничивающие примеры таких способов включают: полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ОТ-ПЦР), ПЦР, секвенирование, саузерн-блоттинг и нозерн-блоттинг.

**[0109]** Кларин 1 был обнаружен в нескольких частях тела, в том числе в сенсорных клетках внутреннего уха, называемых волосковыми клетками. Эти клетки помогают передавать звук и сигналы движения в мозг. Этот белок также активен в сетчатке, светочувствительной ткани, которая выстилает заднюю часть глаза. Хотя функция кларина 1 не определена, исследования показывают, что он играет роль в коммуникации между нервными клетками (нейронами) во внутреннем ухе и в сетчатке. Кларин 1 может быть важен для развития и функционирования синапсов, которые представляют собой соединения между нейронами, где происходит межклеточная связь. Другие названия гена CLRN1 включают USH3, USH3A, USH3A\_Human, синдром Ашера 3A и белок синдрома Ашера типа 3.

**[0110]** Мутации в гене CLRN1 ассоциируются с потерей слуха и глухотой (см., например, Albert et al., *Eur. J. Hum. Genet.* 14:773-779, 2006; и Qing et al., *Genet. Test Mol. Biomarkers* 19(1):52-58, 2015, каждая из которых полностью включена в данный документ

посредством ссылки). Мутации в гене CLRN1 изменяют структуру или функцию кларина 1, нарушая его эндогенную функцию. Сообщается о нескольких мутациях в CLRN1, связанных с потерей слуха. Например, у пациентов с USH3 были зарегистрированы точечные мутации A123D, N48K, Y176X и L54P (см., например, Isosomppi et al., “Disease-causing mutations in the CLRN1 gene alter normal CLRN1 protein trafficking to the plasma membrane” *Molecular vision* 15(191-121):1806-18, опубликованной в сентябре 2009 г., которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Способы обнаружения мутаций в гене хорошо известны в данной области техники. Неограничивающие примеры таких методов включают: полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR), ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование следующего поколения, саузерн-блоттинг и нозерн-блоттинг.

**[0111]** Мутации в гене CLRN1 и кодируемой белке кларине 1 связаны с синдромом Ашера типа III. Синдром Ашера III типа представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся прогрессирующей нейросенсорной потерей слуха, вестибулярной дисфункцией и пигментной дистрофией сетчатки, синдром Ашера типа III (USH3 [MIM # 276902]) уникален среди клинических подтипов синдрома Ашера тем, что проявляется постлингвальной, прогрессирующей потерей слуха и поздним началом пигментной дистрофии сетчатки (RP), а также прогрессирующей потерей вестибулярной функции (см., Kimberling WJ, Orten D, Pieke-Dahl S (2000) Genetic heterogeneity of Usher syndrome. *Adv Otorhinolaryngol* 56:11–18, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Локус болезни первоначально был картирован на хромосоме 3q25, между маркерами WI-17533 и 486D12SP6, в области ~700 т.п.н. (см., например, Joensuu et al. 1996, которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки). В недавней публикации (см., например, Joensuu T, Blanco G, Pakarinen L, Sistonen P, Kaariainen H, Brown S, Chapelle A, Sankila EM (1996) Refined mapping of the Usher syndrome type III locus on chromosome 3, exclusion of candidate genes, and identification of the putative mouse homologous region. *Genomics* 38:255–263, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки), локус USH3 был отнесен к области размером 250 т.п.н. между 107G19CA7 и D3S3625 с помощью анализа гаплотипа и неравновесного сцепления у финских носителей предполагаемой мутации основателя.

**[0112]** CLRN1 дикого типа представляет собой гликопротеин, локализованный на плазматической мембране в трансфицированных клетках ВНК-21. Мутантные белки CLRN1 неправильно локализованы. Было высказано предположение, что часть патогенеза USH3 может быть связана с дефектным внутриклеточным транспортом, а также со сниженной стабильностью мутантных белков CLRN1 (см., например, Isosomppi et al.,

«Вызывающие заболевание мутации в гене CLRN1 изменяют нормальный белок CLRN1 перенос на плазматическую мембрану» *Molecular vision* 15(191-121):1806-18, опубликованную в сентябре 2009 г., которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

#### Полинуклеотиды CLRN1

**[0113]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, например, полинуклеотиды, содержащие ген CLRN1 или его характерную часть, а также композиции, включающие такие полинуклеотиды, и способы с применением таких полинуклеотидов и/или композиций.

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, содержащий ген CLRN1 или его характерную часть, может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления ДНК может представлять собой геномную ДНК или кДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК может представлять собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит экзоны и/или интроны гена CLRN1.

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления генный продукт экспрессируется из полинуклеотида, содержащего ген CLRN1 или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления при экспрессии такого полинуклеотида может применяться один или более элементов контроля (например, промоторы, энхансеры, сайты сплайсинга, сайты полиаденилирования, сайты инициации трансляции и т. д.). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению может включать один или более элементов контроля.

**[0116]** В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 мыши. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 примата. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 человека. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой изоформу CLRN1 человека. Варианты изоформы CLRN1 человека описаны, например, в Vastinsalo et al. (2011) *Eur J Hum Genet* 19(1): 30-35, который полностью включен в данный документ посредством ссылки; номер доступа NCBI NG\_009168.1, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Иллюстративная последовательность кДНК CLRN1 человека представляет собой или включает последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Иллюстративная последовательность геномной ДНК CLRN1 человека может быть найдена в SEQ ID NO: 5. Иллюстративная последовательность кДНК CLRN1 человека,

включая нетранслируемые области представляет собой или включает последовательность SEQ ID NO: 6, 7, 8 или 9.

**[0117] Иллюстративная кодирующая последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа А) (SEQ ID NO: 1)**

ATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGCCGGAGTGTTTCAGTTTTGCA  
TGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTTGTGGATCAAAGCCACTGTC  
CTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGGGCAGGAGCTGGACAAGTT  
TATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGGGTGTGAGGCAGTGTGGGT  
TGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATTTTTTCCAGATTTGCTCAAAGCAATCCCAGT  
GAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTTCTCTGCCATCCTTATTGTGTTAACCATGGTG  
GGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACCTTTTGAAACTCTGCATGGT  
CCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTTCAGGCTCCTGTGGCTGTCTTGTTCATGA  
TATTGTTTGCCTCTGAAGTGAAAATCCATCACCTCTCAGAAAAAATTGCAAATTATA  
AAGAAGGGACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAATATACCACCTCATTCTGG  
GTCATTTTCTTTTGCTTTTTTGTTCATTTTCTGAATGGGCTCCTAATACGACTTGCTGG  
ATTTTCAGTTCCTTTTGCAAAATCTAAAGACGCAGAAACAATAATGTAGCTGCAGA  
TCTAATGTAC

**[0118] Иллюстративная кодирующая последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа С) (SEQ ID NO: 2)**

ATGCAGGCCCTGCAGCAGCAACCAGTTTTTCCAGATTTGCTCAAAGCAATCCCAGTG  
AGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTTCTCTGCCATCCTTATTGTGTTAACCATGGTGG  
GGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACCTTTTGAAACTCTGCATGGTC  
CCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTTCAGGCTCCTGTGGCTGTCTTGTTCATGAT  
ATTGTTTGCCTCTGAAGTGAAAATCCATCACCTCTCAGAAAAAATTGCAAATTATAA  
AGAAGGGACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAATATACCACCTCATTCTGGC  
TGACTAAAGGCCACAGCTGA

**[0119] Иллюстративная кодирующая последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа D) (SEQ ID NO: 3)**

ATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGCCGGAGTGTTTCAGTTTTGCA  
TGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTTGTGGATCAAAGCCACTGTC  
CTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGGGCAGGAGCTGGACAAGTT  
TATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGGGTGTGAGGCAGTGTGGGT  
TGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATTTTTTCCAGATTTGCTCAAAGCAATCCCAGT  
GAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTTCTCTGCCATCCTTATTGTGTTAACCATGGTG  
GGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACCTTTTGAAACTCTGCATGGT

CCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTTCAGTTGCCCTTTGGCTGCCAGCTACCA  
 GGCACCAGGCTCAAGGCTCCTGTGGCTGTCTTGTTCATGATATTGTTTGCCTCTGAAG  
 TGAAAATCCATCACCTCTCAGAAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGGACTTATGTCT  
 ACAAACGCAAAGTGAAAAATATACCACCTCATTCTGGGTCATTTTCTTTTGCTTTTT  
 TGTTTCATTTTCTGAATGGGCTCCTAATACGACTTGCTGGATTTTCAGTTCCCTTTTGCA  
 AAATCTAAAGACGCAGAAACAATAATGTAGCTGCAGATCTAATGTACTGA

**[0120] Иллюстративная кодирующая последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа E) (SEQ ID NO: 4)**

ATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGCCGGAGTGTTTCAGTTTTGCA  
 TGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTTGTGGATCAAAGCCACTGTC  
 CTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGGGCAGGAGCTGGACAAGTT  
 TATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGGGTGTGAGGCAGTGTGGGT  
 TGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATGCTATTTTCTTGACCCCTTCATGGGACTCCC  
 AACAGGGGTACCCCATTTACTCAGCCTGCCCTGCTCAACCTCTTGCAGGAGGGAGCA  
 CACGAGTGAACGAGTGCAGGAACCAGCTGGCTGCTTTAGTGCTGTGAGGAGTAAAC  
 TCCATGCAGGCCCTGCAGCAGCAACCAGTTTTTCCAGATTTGCTCAAAGCAATCCCA  
 GTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTTCTCTGCCATCCTTATTGTGTTAACCATGG  
 TGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACSTTTTGA

**[0121] Иллюстративная кодирующая последовательность кДНК CLRN1 человека (кодон-оптимизированная) (SEQ ID NO: 19)**

ATGCCTAGCCAGCAGAAGAAAATCATCTTCTGCATGGCCGGCGTGTTTCAGCTTCGCC  
 TGTGCTCTGGGAGTTGTGACAGCCCTGGGAACCCCTCTGTGGATCAAAGCCACAGTG  
 CTGTGCAAGACAGGCGCCCTGCTGGTTAATGCCTCTGGCCAAGAGCTGGACAAGTTC  
 ATGGGCGAGATGCAGTACGGCCTGTTCCATGGCGAAGGCGTCAGACAGTGTGGCCT  
 GGGAGCCAGACSTTTCAGATTCAGCTTCTTCCCAGACCTGCTGAAGGCTATCCCCGT  
 GTCCATCCACGTGAACGTGATCCTGTTTCAGCGCCATCCTGATCGTGCTGACAATGGT  
 CGGAACCGCCTTCTTCATGTACAACGCCTTCGGCAAGCCCTTCGAGACACTGCATGG  
 ACCTCTGGGCCTGTACCTGCTGAGCTTTATCAGCGGCAGCTGTGGCTGCCTGGTCAT  
 GATTCTGTTTCGCCAGCGAAGTGAAGATCCACCACCTGAGCGAGAAGATCGCCAACCT  
 ACAAAGAGGGGCACCTACGTCTACAAGACCCAGTCCGAGAAGTACACCACCAGCTTT  
 TGGGTTATCTTCTTCTGTTTCTTCGTGCACTTCTGAACGGCCTGCTGATCAGACTGG  
 CCGGCTTCCAGTTTCCATTCGCCAAGAGCAAGGACGCCGAAACCACAACGTGGCC  
 GCCGATCTGATGTAC

**[0122] Иллюстративная последовательность геномной ДНК CLRN1 человека (SEQ ID NO: 5)**

AGGAGATACTTGAAGGCAGTTTGAAAGACTTGTTTTACAGATTCTTAGTCCAAAGAT  
TTCCAATTAGGGAGAAGAAGCAGCAGAAAAGGAGAAAAGCCAAGTATGAGTGATG  
ATGAGGCCTTCATCTACTGACATTTAACCTGGCGAGAACCGTCGATGGTGAAGTTGC  
CTTTTCAGCTGGGAGCTGTCCGTTACGCTTCCGTAATAAATGCAGTCAAAGAGGCAG  
TCCCTTCCCATTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTTGAACCTCGCCCTCACAGAAGCCGTT  
TCTCATCATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGCCGGAGTGTTTCAG  
TTTTGCATGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTTGTGGATCAAAGC  
CACTGTCCTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGGGCAGGAGCTGG  
ACAAGTTTATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGGGTGTGAGGCAG  
TGTGGGTTGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATGTAAGTAGCAATTGCATTTGAGT  
TATTTAATGCTTTAGGCAGACTCTTCCCAGTGTTGCGAGGAATTATATTTGAGAATTT  
TGCCGTGTTTACTGCAGGACTTTTTAAATCGGTGTGAACCATATGAAAAACCTATGA  
CTCTGAGCAATTTCTTCTCCTAGTTTTTATTATTTTATACTTGCTTTTTTATTATAATA  
TAGAGTTAATTCATTGTTACATAATTAAGGTTTTTGGAAATATTGGCAATTAAGATG  
CTTAAGTATTAATATTTATGTAAAAAATTATGGAGTCTTTTTAAAAAAGTAAACTTG  
GGGAAATAGGAAAGCTGTAAAGAATGATCTTTATGCTTTTTTGTCTTTATAAAAAGA  
ACCAAGGTCATGGGCTCCGTATTTAACAGGTTGCCACCTTCTCATGATTTTGTTTC  
CTGCTCCCCACTCCCTCCATTATTCCTGCTAAGACCTTTCCTGCTGCTAAATATTCA  
GTTTTCATTTTTAACTAATTTGGAATCATTGGCTATAGAAATTTAAAATGATCTGCT  
GTGCTAACTGGGAAAGAAATGGATGCCTATTTAGTATAGAACATTTTAACTGATTG  
ACCTGCAAATCATGTAGAGAATATGAGAGAGATTTTCTTGTTGTGATTTTTGTGAAA  
TGGAAGTGTAATCCACAGTATTTATAACCTGTTTATCTTAAGAAGAGAATTTTTAAA  
AATTACCATGTGAATAGGCAACTCATTAAATGAAAATTAATAGGAAGTCATTTGTTA  
TATCTCTTACAACACACATTCAGAAGTTATTATTATTTTACAAGGGGCTGGTTTGGAA  
CAACCTTATGAAGACACAGTCAGTAAATTACTGCATAAATCACTCTTCAGGAAAGG  
AGGTTACCAACTGAAGCATTAAAATGAATTATTATTTTGCCAGGTTTTTTTTTTCT  
TTCTAGTATAGGTAGAAGGCTAAATTAATTGAATTTATTATTAACATATGCAGTGCC  
TAATTAATTTTCAAGTGCTGGTCTATTTATATTTCTGCAACATTCCTTATATCTTCTTAG  
CAGTCATTGGACACCAACCTTCAGCTCACATAGGTTACTAAGTGATATGAATTTTCA  
TAGGGCTCCAGAAAATTTCCAAGAATTGGTTGTTAGCTTTTTAATTGATGAAGTGGA  
TACCAGTTCTTTTCACTGAATGGCTTTTTATTCAATTAAGGTAATGGGGCTGTTAGAGTT  
GCTTAGTTTTCTGGGGAAGGGGAAGGAAGAAAACAAAGCAGAATGTCATGTGATA  
TGCAACTGTATTAAAAAACCGAAAAGGAAAAAAGTTGAGAGAGATGATTTAACCGT  
GAGTCACCGGCAGCCAAAGCGTGAGTAAAGCTTCTCACAGATGAATTTAGACAAAA  
GCGGAGAAGGTAAGTACTGGTGAATTTCTGGAGCCTTACATTTTCTACAGTGAAATGGA

GATAAACTTTACTCATGCCATAGGACATGTTTCAAACAATAATAAGATGTTTTCTG  
AACACTTACTACATACTAAGCACTTTATATGCTTTGTCTCATTTAATCCTTACACAGC  
CACATTCTTCTGGGGTTTAGCGAATGATTTTTGTGGTTGTGTCCTATGCTTGTCTGT  
CTAAGGATGAAGTTGTTCTAATTGGGTGCCCTCCTTTTGCTTTCTGTGAGGACTTGC  
AGAACTGGTGGGGTTTAAACAGTACCCTCACTTATCTCACAGAATTCATTAGCTCC  
CAGATACCCTGACATTCTCCCCCTAGCCTAGTGAAGAAAATCTTCCATTTACTTGT  
CATTCTGCAGTGACAGCTCCATCAATATAACAATAGACTATAACATTAAGTGTACTG  
TATATACTATAACATGTTAAAAATCTCATTCATTTTGGTGAGGCCAGCTAAGAATAC  
TTACAGTAGAGCTTTTTTTTTTTTCTAAGCATAAAAGTATCTTTTTCAATGCAGCAT  
GAGACAGAGTTGGGAAAACCAAATAAATAGATCCAATGGACTCCCCAAAGAGGA  
TAATATTCATTTAAATAAACACCCCTCTCAGTGTTAAACTTTCTAATCAACATGCCT  
TTGGGACACATTGCACCCTCAAAGTTTACACTCCCATTGCAACGCAGCTTTGTGGTT  
CACGTTTTTTCCATTCAGAATGTCATTACCCTGTCAATGATGTTTCATCAACGTTTGC  
TTGGATGAGAATCCTCTGATATTCTTCTGATAGAAATGTATAAGCCCTGTTCATAT  
AAATGAATAAAAGATCTAACCTTACTTTCTCAGTAGTGGCTTCCTTGGAGCAAAAAG  
CAGGGACCTCCAGAGAGCTCAGGTGGATGACTCTTTTCTGTTTCTTCCAGAGCTCAA  
CTTACAATTAGTGCACAATTCATTTCCAGAATGTCTTCTTTCTTATTGTGCCTTTAG  
AAAGTTATTAAGCAAACATTTGAATTCACAGAATCTTACCAGTGTAAGAGGAATGG  
AAAAGGTAACCTTATCAAGGTAACAATCACTTCGTGGCCAGTTTTTTTCGGCTCACTGC  
AACTACCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGA  
CTACAGGCGTGCACCACCATGCCAGCTAATTTTTTTTTTGTATTTTAGTAAAGACA  
GGGTTTCACCATGTGGGCCAGGCTGGTCTCATGGCAAGTTTTCTTTGTGTTGTCATGT  
TATTATCAATTAATAGGAATTTATATTTTCAGTTCTGTTAGGTGGATAAACACTATTTT  
GCATACCTAAATGTTTCATTTATATCAGCACTGGCCAATAAAAATATACTATAAGCA  
GGCCGGGTGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAACTTTTGGGAGGCCAACACTTTGG  
GAGGACACAGGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTAACCTGGTGAAATCCCGTC  
TCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTGGCGGGGGCGCCTGTAGTCCCAGC  
TACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCACGAACCCGGGAGGTGGAGCTTGCAGT  
GAGCCGAGATCTCGCCACTGCACTCCAGCCTTGGTGACAGAGCAAGACTCTGTCTCA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATATATATATATATATATATTACA  
AGCCACAAGCCACATATGTACTTTTAAATGTCCTAGTAGCCATATTAGAAAACAAAA  
GTAAAAGGAATAGATGAAATTAATTTAATGATTTTTTTAAACCAAGATATCCAA  
AATATTATCATTTAACATATAATTAATAATTTATTGAGATGTTTTACATTGTTTTT  
TTTTTCTTGACGCTGTCTTGGAAATCTAGAGTGTATTTTACATTTACATTACATCTAA  
TTCAGTCTAGCCACATTTACATGCTCATTTTTTTGTGTGTGGTTTTATGGAGCAGAG

AGTTTAATAGGCAAGAAAGAAAAGAGAAGGCAGAAGAAAATGGCTCCCCTGTACA  
GAGACGCGGGGGTGGGGCGCTCCAAAGCCAAAAGAGGAGGTCCCTAAGTATGGTA  
GACACCAGCCAGGAATATATGCAGTGTCTGGAGGAGGGGATGTCTGATTTGCATAG  
GGTCACATGCTCATTFFFFATGGCTACTGTATTGGTCAGTACAGATTTAGATGGGGAT  
TTGCTCTGAACAAGTTGGTGATTGATGGTGTTTCATATTTTAATTGAATTTTTCCTGGG  
TTCTGCTGTACACTTGTATGTGTGTTAGTTTCATGTGCAATGCTTGTGTCACTTTTAA  
AACCCAGATATATGGCATAACATGAGAATGAAAAATGGACCAGAAAAATAGTTTGG  
CAATGTAGTCATGTTTGTTCCTATTAAATGTTCCCTATTGACCACTCTATCTCTTTTA  
ATTATAACAAGAATCTGCCCTGCCAGCATGCCAGTTACGCTGGGAAAACCTTCTGCC  
TCATTTACTCTGGCTGATTCTCATCCACTTATGGGTCAGTGGTTCATTTTCTAGAGGT  
CACCAGCATTACATACCTAGCATAACAATTCATTCATTATAATGAAGGAATGTTTTCC  
CTTCAAAGAGACACAACACTAGTGGGCTTAATTTTTCTTGATATGTCACCTGTAAAATT  
TTAATGATGATGTTTAAACTCTAAATGTAGCCATCAAGACAAAAACTGCAAATTTTG  
AGCCTCAGTGTGTGTGGGTGGGTTTCTGTTTCGGTAATTTGAAACATTGCAGAATAT  
CATCAAAATATGATACCCAAGAATCATATGGTATCAATCATTCCCTAGATATACTGAT  
CTATTCATTGCCAAGATAGTTCAATGAGCTGGCAAAAACATATGGAATTATTTTCTT  
AAAATGTGAAAAATAAAATTTAACCAATCATGTATCACAGCTTGCAACTTTAGTCAT  
ACTTTGAAAAGCATTTTAATTTGGACCTCATGATTGAAAATTTATAAAAAGCTGAAC  
AGAAATTAGTTCACTTCATATTTTAGAAAAGCAGAGTTTCTTTACTAAATGAGGCAT  
TTGACCCAAATTGGAGAGAAAATGTTGAAACTACTTCTGTGAGCAAGCAGGTGGCT  
TCTCAAACACATGTTGGGATGAAATGGTTGGGCCTCAGGGTCTCAGTGCCTGTCACT  
GAGAGTTGGCACTCTCTATCTCCATGGTCTCCTCCAAGTGTGACTCTTGTCTCTTGCT  
GACCTGACCTGCCCCAAGTGACTCACTGGTCATGACCCTGCACACCTTGCGTCTCTC  
CTATCACCTGCCGATGGCAGAGCTACAAAGGTCTTTGATGTAGCTCTGTCTGATAT  
CCTGTGTTTCCCCCTATGGTCTGTGTGGAAGCAGGTATGGGGGTGTGTAAAGGGGAA  
GCCTATGAAGTTCATCTGCAAAGACTACCTGGTTAGGGGAGGAGAGGAAGAAGCTA  
TATGCACCATTTCACCAGCAAGCATGGGCTCTTCTGCCTTTTAGCTTAGGGGTCCTGT  
TGTCTAGTCTCACTCACCTATTTAAAACAGTCCAGCAAATAGAGGTTTTGTTTACCTCC  
CATTAAAAAAAAGCAATTAATGGAATAGAAGATAATAATGTATGAGAAGCACTAT  
TGTGAAAGAAAACCTTCAACTTCTCTCAGCCAAATAATTGCTTCCTCCTCTGTCCTT  
CCCAGACCTTGATGTTTGGCTCTATTATTTCAAACAACCTATATTATAAATATTTGAGA  
ATGTGTATTTCCCTGCAAGGAGATCTTAATCCCCAAGAAGGCAGGAGCTGTGTATTA  
TTCATCCCAGTGCTCCTTCAAACCAGGGCCTCAGACAGTGCATGGCCCAAAGAGGTA  
CTTAATAAACGTTTGGTAAACTGACACTATTGAAATTAAGCAACCTGGATTTGAGGT  
GGGTCTCTGCCACTACAAGAGATTACGCTTTGAGAAAATTCATCACTTCATTGAT

TTTCAGTTCTTGCATCTGTATATGGGAGACGATACTAGGTGATTTCTGACATCTCTCA  
CCGTTTAAATGCTCTGTGATCTATAACAACGAGGGGCTCGCTGTTCTAGACAAGTCC  
TTCCAGCTTTACAGTTGCATAACCCTTCTAATCTTAGTCACATGATGACTCCACTGAC  
AGATTTTTGGCCACCATCATTAGACATGCTGAGTTACGTGTGCCTTTGCTCTGATCCT  
CAAACCTCATGATTTTTAAAGTTTTCTGAAATATCTACCATTTATCAGGATCCAGAT  
GGATTTTCATGACCAAAGTGGATGTTTCTTTTCTCTCCCATTACAATCTTTTACTTTTTG  
TGTGGGAAATTGCATGTTAAAGAAAGGGAAATTGAAGAATGGGATGCTTTGGAATT  
CTGGCAAGATGGATTAGTGGGTTCCAGAAAGTAGGGGCAGCCACAAATACCGAAAT  
AAATGAGATCGTATTATTGAGAAAGCACAAATGGAAGAAGGTCAAAGCAAGAAG  
AAGCTGACATCCTGCTTCCCTCCAATTTTTGCTTTCTCTGTTTTTCCAAGAACTCCTCT  
TCCAAGCCTTGCTGAAAACTCCACTTTCCTAAATCTAACTTCTTAAACTGATAATG  
GCAAGAAGTTAGGAATGACCAATATGTTTAACTCCAAGAGTATTTGTTTTGTTTT  
GTTTTGAGACTGGGTCTCACTCTGTCGTCAGCCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCACA  
GCTCACTGCAGCCTTGACCTCTCCTGCCAAGGAATCCTCCCACCTCAGCCTCCTGA  
GTAGAAGGGACCACAGGCATGTGCCACTACACCTGGCTAACTTTTAAAAAATTTTT  
TGTAGAGATGGGGTTGCCAGGCAGGTCTCAAACCTGCTGGGCTCAAGCAATCCTCCT  
GCATTGGCCTCCCAAAGTGCTGGAATTATGGGCATAAGCCACTACGCCTGACCTCTC  
CAAGGGCATTCTTTACCCAGAAGAGGAACTTGGCAGAACTTATCCTCCAATTGGTGA  
GGAATATGGAGAAAATGACTTTAAGCAAAGGAACTTCTGGTTCTGCCTACCTAATCC  
AGAAAAAGAAGTTTTATTTCTCCCTTCCCCTAGTAACTATCTTCCCATATTCACATAA  
AAAAGTACAGAATCAACATTGTTCAAGAATTATAATTTTACTTGTAAGCACATGTGC  
ACACGCACACCCATATACCTTCCCTTTAAATCATCCCACACCCTAATAGTAGT  
AAAATCATTGACCCGAGCATACTGGGAGAGGAAGAGGAGTCTGACAGGGGCAGG  
TTCTAAGTGGCACTCCTGGAACTTAACCCTGGTGTATATGAACTTTACCTATTGAAG  
GATGACTCCTCAACTGTTCTCACAATTTGCTGCTCTGCTTTCTTTTCTAATTTCTGAA  
GGTGACTCATCTTCCCAAGGACTTTCAGACTTCTCAGAAGAAAAAATATTGGGTG  
GGTCTCTGCCACTGGCAAAGATTAGACTTTGAGAATCATAAAAGTATATCAGTATA  
TACTCATTAAATATTGAATTACTATAATTAATATTATGATATTGATATAATGATAGAAT  
GATATTGATAAAAGCAATATTCAATAATGAATATTATTTAGCTGCCCACTTATTGG  
GTGCCTCATAGGTGCCAGGCATTTTGTATGTATTATCTACAACCCTTACATGGGACA  
TATTATGATGCTGTTTCTCTTGAAGAAATATGGAACTGGAAACAGAGAGGTCACCA  
CAATTTTCAAAGTCACATAGCTAATAGGTAGCAGACTTGGGATTCAAATTCATATG  
CATATGGTAAATCATGCTCTTCCCTCTGCTACATTTTGCCCCCTTAGAATATGAAAA  
GGGATACAAAGAGATGAAGAAAATATGTAAGATTATCCTTCAATTTCACTATCTTTT  
TTAAAGTTTTTTTTATTATACTTTAAATTCTGAAATACATGTGCAGAACATGCAGGTT

TGTTACATAGGTATACACGTGCCATGATGGTTTGTTCACCCATCAACCTGTCATCT  
ACATTAGGTATTTTTCTTAATGCTATCCCTCCCCTAGTCCCCCACCACCGACAAGCC  
CCGGTGTGTGATATTCCCCTCCCTGTGTCCATGTGTTCTCATTGTTCAACTCCCCTT  
ATGAGTGAGAACATGCGGTGTTTGGTTTTCTGTTCTGCGTCAGTTTGCTGAGAATG  
ATGGTTTCCAGCTTCATTCATGTTCTGCAAAGGCATGAACTCATTTTATGGCTGCA  
TACCATTCTATGGTATACATGTGCCACATTTTCTTAATCTAGTCTATCATTGATGGGC  
ATTTGGCTTAGTTCCAAGTCCTTGCTATTGTGAACAGTGCTGCAATAAACATATGTG  
GGCATATGTCTTTATAGTAGAATGATTTATAATCCTTTGGGTATAGACCAGTAATG  
GGATTGCTGGGTCAAATGGCATTCTGGTTCTAGGTCCTTCAGGAATTGCCACACTG  
TCTTCCACAATAGCTGAACTAGTTTACACTCCCACCAACAGTGTAAGCGTTCTTA  
TTTCTCCACATCCTCTCCAACATCTGTTGCTTCTGACTTTTTAATGATTGCCATTCTA  
ATTGGAGTGAGATGGTATCTCAGTGTGGTTTTGATTAGCATTCTTTAATGACAAGT  
GATGATGAGCTTTTTTTCATGTTTGTGGCCGTATAAATGTCTTCTTTTGAGAAGTGT  
CCGTTTCATATCCTTTGCCCACTTTTTAACGGGGTTTTTCTTGTAATTTGTTAACTT  
CCTTGTAGATTCTGGATATTAGTCCTTTGTCAGATGGGTAGATTGCAAAAATTTCTT  
CCATTCTGCAGGTGCCCCGTTCACTCTGATAATAGTTTCTTTTGCTGCGCAGAAGTTT  
TTTTAGTTTAATTAGATCCCATTTGTCAATTTGGCTTTTGTGTCATTGCTTTTGGTG  
TTTAGTCATGAAGTCTTTGCCACGCCTATGTCTGAATGGTAATGCCTAGGTTTTCT  
TCTAGGATTTTTATGGTTTTAGGTCTTATGTTTAAATCTTTAATCCATCTTGAGTTAAT  
TTTTGTATAAGGTATAAGGAAGGGGTCCAGTTTAGTTTTCTGCATATGGCTAGCCAG  
TTTTCCCAACACCATTTATTAATAGGGAATCCTTTCCCGTTGCTTGTTTTTGTGTCAG  
GTTTGTCAAAGAGCAGATGGTTGTAGATGTGTGGCATTATTTCTGAGGCCTCTGTTC  
TGTTTCATTGGTCTCTGTATCTGTTTTGATACAAGTACCATGCTGTTTTGGTTACTGT  
AGACTTGTAGTATAATTTGAAGTCAGGTAGCGTAATACCTCCAGTTTTGTTCTTTTTG  
CTTAGGATTGTCTTGACTATTCAGGCTCTTTTTTGGTTCCATATGAAATTTAAAGTAG  
TTTTTTCTAATTCTGTGAAGAAAGTCAATGGTAGCTTGATGGGAAAAGCATTGAATC  
TATAAGTACTTTGGGCAGTATGGCCATTTTCATGATATTAATTCTTCCATCCGTGA  
GCATGGAATGTTTTTCCATTTGTTTGTGTCCTTTCTTATTTCCCTGAGCAGTAGTTTGT  
AGTTCTCCTTGAAGAGGTCCATCACATCCCTTGTAAGTTGTATTCCCTAGGTATTTGT  
TCTCTTTGTAGCAATTGTGAATGGAAGTTCACTCATAAGTTTGCTCTCTGTTTGTCTG  
TTATTGGTGTATAGGAATGCTTGTGATTTTTGCACATTGATTTTGTATCCTGAGACTT  
TGCCGAAGTTGCTTATCAGCTTAAGGAGATTTTGGGCTGAGACGACAGGGTTTTCTA  
AATATACAATCATCTCATCTGCAAACAGAGACAATTTGACTTCTCTCTTCTATTTG  
AATACGCTTTATTTCTTTCTTGCCTGTTTGGCCCTGGCCAGAACTTCCAATACTGTG  
TTGAATAGGAGTGTTACCACCTATTTAAGAATAGTATTGAAGCCTCACAAAAGCT

GGTTCTCATGTAACCATCTGAGAATATTTGGCCTTATGACTTGAATTCATTCATTGCC  
TTTTTATTTACATTTTAGTGATCCTGATGTCTAAATCTTAATCTTTGATCCTTGCAAG  
GTAAAATAGCCAAGTCAAGCCTGTTTAATAATATTGGTTGAGGAAGTCACATGCTTA  
TGATCAATCTTTGGGTTATGTAATTATATTACCTTAATGTTGGCAGTTTAGGTGTAAG  
GCAGAGATATCTGATCACATGTGTGGTTAGCTAATTTAAGATCACTGCCAACTAAAA  
TCTTCATGGTATGATCTTCAAAGTTAGCTACTTTGACCACAGCAATGATTTACCAC  
AGCAATTAACAAAATGGCAGACTCTTTCCTGAGGTGGCATGAACAGTTTTAAAACA  
AAGTCAAGGACCAAAGAAAAGCAGGCACATGGCATTGATTTCATTTCAAAAATA  
GTATTGTATTAAGAGCCAAGGGGATAGAATTGTAGCATCAATTAATAATCTTGTTGA  
AAAAAATAAAAACAAACGTCCATTTTTATCTCTCAAATATATTAGGGTTTTCATAA  
AGTTATAGGTGTATTTTTAAAAAAACAAAACACTCATATACATTAGACTGAAAAATTTG  
CCTGTCATCTCATCATGCAGCTAAATGCAATTGTCTATGGCGAGATACTCTTATT  
AGAGGTATGATAGCACTAACTAATAGCAAACCTTTGTACCTGGTAGTCTAATTTATGC  
AGGGTTCATATTTTCGCTCCCTCTCAGCATGCTGTAAGTGTGGCAAAGCCATTCTCAG  
GAGTTATTACCCCAACATAATCATACCCCTGTGGATTAGGAGCAGTTAAATGGGTCC  
TGTTATCAGAGACACATATGTGCCACAGCCGCTGTCATCCCTAAGCCACCGTGGGTG  
ATTAAGACTCACTGATGGGACTACCTCTGAATAGGCTTGAGTGAGGTGGATACACTT  
CAGCTGAGAGAAATTCAGGTAAGGGGCTGAGAAAATCAGATTTTGAATGGTTTTAT  
CATACCATCAGGTCTCCTTTTAAGTGCTGGGGTCATGGATTTTCATTCAACCTGACCA  
CATAGCCTTTGGAAGCTTGCTCAATACCTGAGTGTGAGATTATGGGTGATATTA  
GGAGATGAATGCATTGAGCTGATGTCAGAGAATGTCTTTTACTGGATTTTCATAATG  
ACTGGCTGCAGATGGGCTGAGGGGAAAGTCAGATCAAGAGCATTCTGTGAAGAAGA  
AAGAAATCTTCCCTCTTATTCTCTTTCAAGAAAATGAATAGCTGAGCACCAAGAGGC  
CAAATACTTTTTTAAAAAACACATCCTTTTATGTAGAGAAGGACAGGTTGAGACGAA  
AACAGGACCTCTGAAACTGTCTTTATAGCTTTAATCTAGGAAGAAATTGCGGCACC  
ATTGCTGACATCATTATCAGAGGCTGCCTTAGTTCTGAGAGCTTCACAGATGGCCTT  
TTCTGCATTTTACATCTGGCCAGATGAAGGCAAAAAGGTTGATGAAACCAAACTAT  
TAGATCAGTGGTCCATAACTCTGGCTGCACTTTAGAATCATCTGGGGAGTCCTTAAA  
ACTACTGATCCTGAGGCTCCATCCAGACCAATTGAATCAGGATCTCTGGGGGTGGG  
ACCTGAGCATTGGAATGCTTTAAAAGTTCCTCAGGGACTCTAATGTGCAGCCAAGGC  
TGAGAATGACTGAGGTGGATGGTGGCCAAGACAGGTGAGGCCAAGAGTTAGAAGC  
CCTTACTGTTAGGGAAGGCAGAAGCCACAAGGAGGAGGGGAGGGGGAAGGAGCAG  
TATTTAGCATTTCTTCCACACAGTTGGGGGGTTTTCTGATCAAAATTAGGCTGGGAT  
CTTTCGCTTCCATTTTCATGAAGGTCTTATGCTTTGTCCACAGCCACCTGGCCTCAGG  
GCAATGAGCAATCTGATTGATGAATTTTCAGTAAGAACTGAGCACACTTGGCTCTC

AGCCCCAGTGGCTTCCCCTGTTTCCAAATCTGCCACCAGTTACAGGAGCCTGCTCA  
CCAACTGGTTGGGTAAAGAAGTCGGCTCTGTCCCTGGCAGGGAGGCCTTCAGCTGT  
CTGGCCCTGTCTGTGACTGCGTGGGTGAAGCTGCCTAATTTGGGGAACTTGATGGAA  
GATCTAAGCTATGTTCTCTAACAGTTTTATCAGAAATAAAGTTAACTTTTGACCTCCA  
TCTGCCTGTCTCCTGTGGAAGGGCTCTGCTCCTTCCAAAGAGACTCTCAGGGGTCT  
CCTTAGAGGTGTGTTATCAGTCCAAAGATCATTTTAGACCAGCCATTACAGAGGATG  
TCCAAGAAATTGCACAAGGGAAATAGAAGTAAGAATGAGAGCAATATATCAGATA  
GTAAGGAAAGTATGTGACTGGTTTCAAATAAGTAATTAACCATAAATCCAAAGTTCC  
TGCATTAGTTATAGCAATAGTCATCCACCTGGTCAGGAAAAAAAAAAGTAAAAGACT  
GAGCTGCAAGATAGAAAGTTTGCCTGAATTCCACGTA CTCAAGGACTACTATGGA  
GGATTCTTGGTCCCAATGCAGAGACATGTACTCTGACCACCCATGGGCCAAATCCC  
TCTTACCACCCTCAGTGATTCTCCTGGGACCTCACTACATTGAGTTCTTACATTCC  
CCACTCTTTTCGGGGGAAATATAACCTTCTGCTCTTCTCATGATGTTAAAAATATTT  
AGACAATTACTTAAAATTTACAACAATCTTCCACATAAATGATCTCACTTATGTTTCT  
TGTGAGCTCTGTGATTTATTTCTATTATCATCTATGCTGATAGTTAAGGAACTGAGA  
TATCGAGACCAACATGCATAGTAAATGGCAAACCAGATGAATTTTAACTTTCTTA  
ACTCCAAAAGCCACATCCTGCCAACCCGCCATGCTGCCGCTCAGTTAATGCCTGGC  
TGTTTGTCTCCCCATTGGCCCCTCTACCCATTGTGCTTTGATGGCACACTGTATTCCA  
ACTGCCTGAGACTCCTGGTTAATGCCATTACGTACAGACTTAGGTTGAATTTACTAG  
GATTTTTAAGATTTGTAGGATAAGAGATATGACTGTTAGACTGGAATCAGCAATAGA  
TAAAAGGTTAACAAAGTTTCAGAATAAAATATAATAGAAAACCCAGCAGATAGAA  
GTAAAATGAATGGTAAGACA ACTGAAATGAAAGCCATACATTTAGAAATATCAAAT  
AAAACACAGATTAATGGCAGACAATAAAGGAACATACTTAGCAGTTAGTAAAAACA  
CTTTTACCTTATTCTTATTACCCTCCAGTAACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAA  
AGTCTCGCTGTGTCGTCCAGGCTGGAGGGTAGTGATGTGATCTCGGCTCACTGCAAC  
TTCTGCCTCTTGGGCTGAAGAGATTCTCCTGCCCCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACT  
ATAGGGGCCATCACTGCACCTGGCTAATTTTTGTATTTTATAGTAGAGACGGGGTTT  
CACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTGGCCTCAGGTGATCCACCCGCCTCA  
GCCTCCCAAAGTGCTGAGATTACAAGCGTGAGCCACCAAGCCCGGCTGTAACCTATT  
GAAAATAACATTACTTGACATGTGAGACAAATTATTTGTAAGTTAAAGAGTTTATGT  
GCCTTCAATGCTCCCACCCTTCCCTCCCCTAAAAAGATTATTGAGTGCCCATGATGT  
GCCTAAGCCTTCTGGTAGACTCTGAGAATGTGAAGAGAGTTAGAGGATACTTGTTCA  
ACAACCCAGAATCTAGCAGAAGTGTTTTGAAATGACCAGCCACTTGGGAGAGCTAT  
GCTAGCATATCATTCAGGATGGGCTGGGTCATGTTTTAATAACAAGTTTGAAC  
TTTATAGGTTTGAACA AAAAAGATGTGTTTCTTGCTCACAGTTCATATTTTTTGGAG

ATTGGCTGGAGCTTCATTCCAGGATACTGCCACCATCTGGAATGTTGACAGTTACCG  
TAACAGAGAAAGAGTTGTGGAGGCTGTCACACTGGCAATTAATTCGCTGACCTGG  
AACTGACACATGCCACCTCCACTTATATTTTATTGGCCAAGGCTTGTTACACAGCCA  
CATCTAACTTCAGAGAGGTCAAGATGAGCAAATCCTACCACGAGCTATAGATGGAT  
GAGTAGCACTCATTATTATCACAATTATTTTATTTGTTATAAAAACTCCAAGAAGGA  
GAGGTACTCTATGTGAGGAATAGGCATAGGAAAATCAGAGGGAAGTTCTTAAAGAT  
GAGCTAGATTTCACTAGATGGCATTGAAGAAACATTCCAAGTAAATGAACAGCATA  
AGCAAATGCATGAAGA ACTTATTGTGGTCCTAGTACAGACGATGCGTGAGAGTGTG  
GAGGAGGGAAAAGGTAAGACTGGAGAGGAAGGCAGGAACAGGACAGAC  
TGTGTTCACTGTCAGGCAGTTAAGTCTATCTTGTAGGCAACATGAAGCCTTTTAAGG  
AAGGCAAGCAGCTATGTGACAGGACAGAAGATGGATTGGAAGAAAATCAAAGAG  
AAGTGGGGACCAGTCATAAGGCTCCTCCAATATTTGGGGATCCAAACCAAAGCACT  
GGCAGAGAAATAGAAAGGAAGGGAAATATTTCCAAAATATTCAAAACAGAAACCA  
AGAGAACTTGATGACAGAAGATGAACCCAGGTTTCTACTGAATGGACAGTTGTTAC  
ATTCTCTGAGATAAGGAATACAGAAGGAAAAAGTTGAGAGGGAATATGAAATTATT  
TTTAATCATGTTTAATTTGATCACTTGTGGAACATCAACCAGAGATGTCCATCAGTT  
ACACCAATTTGTAGGTTTTGAGAGAGGCCTGAGGTAGAGGCAGAGAAGTGGGAATC  
AGCAGATTAGCGGCAGTAGTTGGAACCATAACTGAAGATGAGATTTCCAGGGAGG  
GGAGTTGAACAGGAAGGTAGACAAAGGCTGAGTGCAGTGGCTCATACTGTAATCC  
CAGCACTTTGGGAGGCTGCAGTGGGTAGATCACAAACAAGATCAGGAGTTCAAGAC  
CAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAAACACAAAAATTAGCC  
GGGCGTGGTGGCACACACTTGTAATCCCAGCCTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATT  
GCTTGAACCCGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCGTGCCATTGCACTCCA  
GCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCCCCACCGACCCCTAAAAAAGAAAGTAGA  
CAAAGATGTGTCCTAGAAAACACTAATATGAATGGGTAGAGAGGGGAGACTTGTC  
AGGAGATCGAGGGGAGAGTCAGTGAGGTGAAACCTTAGAGGATAGACCTTCACCAA  
GGAAGTAACAGTCAACAGGCCTAAATGCCACAGAGATGTCAAATGAGAGACACTGG  
AAATGGTTCTTTGAATATTACAGCCAGAACATCACAGGAGACCATTTCCAAAGCAGT  
CTTGATGAAGTGGTGGGGAAGGGAGGTCCCTGAAGGAGCTAAGGAGGGACTGGGA  
GATCATGACCCAGAGATAAGTGTTGCAGGTATAAAAGGGAAAGACTGAGATCAGGA  
AATAGCCACAGGATCCCTAAGGCCAGGCTTCGGGTGGGGTGGTGTGTGTGTGTGTGT  
GTGTGTGTGTGTGTGTGTATAAAATGGGAAGACCTTGAGTATAATTCTGTACTAAGA  
AGATAGAGCAGTAGAGAGGAAAAGGCTGAAGACAGATGGGAGGGTAAATAGTGAA  
TTAGAAAGGTCTGTGCAAAGATGAGAAAGGATGAGTCTGAAAGCACAGGGAGAAG  
GGCCAGCCTTGGACAGGAGAAAACATTTCTTTCACTAAGAATAAAGGGAAGGTTGG

GTATACACCACAAAGAAGGTGTAGATGGGTGGCAATGGAGTTCTGTCAAGTTGAGG  
GCATTCCATGATAGCCTCACCTTTCTCTGTGAAATGAGAGAGTTTAGTTTACAAGAT  
ATTTCTGAGCACTTCATAAGCCAGGTTTCATAGACTGAAAGAAGTGGAGGTGGAGTG  
TGATAGGTCTTAAGAATAGGGGAAGTTTGGAAATATCTGACAAGGGACAGAGAGGA  
AAAAACTAGAAAAGGCTTTGCAGAATGTGGGCCACAGATCAGAGGCTAAGGGGTC  
CCATTTGTGCAGGAGAGTAAGGGCAGGGAGGCAAGGCTCACAGCCAAAATATAG  
AGCCCCTACCAAATGACTGCAGGAGGGCAGCTTTCCTATGAGAGCATCCCTATCAC  
TGTTTTCACTCCGAGTCATTAACCTTACGACTTACTCAGCTCTGTTTCGTAATAGCAGA  
CTCGAGTAATGAGGGTATGACAGCCTCTCTCTGCATGCCAAGGTATGCAGCGTGGAT  
TTCCTTTTTCGCTTTCTCTCTCCTGTGGCTTAGGTGCCTTCTGTTCTGCTACCAGGATA  
GAGAACCCAGTGACTAGTTTCTTCTAGCTCTCTTTTTCTGACTAGGTATCTTGTGAGA  
AATTTCTGCTTACCAGACTTCATGGAGAGGGAATCAAGCTTTGAATCAGGGTTGAAA  
AAGTAGAGCTTAATATATATATTACAAAATGCCACTCACGTTCTTGAGGTTACCTTG  
TATCTATAACCACA ACTAGCATTCTTTTAGAAAGCACCATTACCGAAGTAATCCCTTT  
CCTGGGAATTCACCCAAAAGGTTATTCCCACTTATCCCCATCTCCAAAATAAAAA  
AGAAAATGTGTGTGCTTAGAGATGTTCCCTGGAAGCATGAGCTGTAATACTGAACC  
AATAGAAGACGA ACTAACAGATTGCAGGGCATCCGTTTGGCAAAA ACTTATGCAG  
TTATCTAAATGATAGTTATGAAGACAATATGTATAACACATTATATTCTGAGTGAAA  
AGAACAGAAGGTGATTTCAA ACTGCATTGGGATAATAGTAATATAGGAAATAGTG  
AGATGAACAAAGATTTCAAAGGAACAAAATAAAGAAAAATTTTGCTTTTTATATT  
GGTAGGCGTATGGGTGAAATTCCAATTTTAATTTAATTTTCATAGTTATAAAATTGTT  
CATAAAAAAGGTCCCCATAGACAGTTGGGCTTTGGGACAACTAACAGAAACAG  
AGTAGGAAGAAAATTCATCTTCTTCAATCCCCTTTCTCTGCTTAAAACAAAACAAA  
AAAGAGCTTTGTCATGTT CAGGTGTGCAACGAATCTTTTTCCAAATCTGGA ACTTT  
ACATCTGCTATTA AACAGGAGTCAGTTTCCATGTAACATGTTGACAATCCCCCAAGT  
GTGTTGGAATAATTTTTTTAATGAGGAGATTTGAAATTCCATTTCAATTGCCAACCT  
GCCTTTTCAACTTCTAAAACAAAGTAAAACAAAACAAAACACACTGGGTCCTA  
TCACCCCTCTTGCTACTACTATTTTATCTCCATTGCCCTGAATTCTTTCCAACTTCT  
TTCCACCCAGCTTTGATTTGTTTT CAGTCGGGTTTATTGAGGCATAATTTACGTACAG  
TAAATTCATCCTTCTTAGATTTAGAGGTCTATGCATTTTACTAATGCATATTGGCT  
TATAATGACTACCACAACAAAGATATAGAACACACCCATCACTCCCGGGTTCTCCCT  
GTCCCTTTTTTGGTCCATCTCCTCTCCTACCCCAACCCCTTGGCAACCACTGATCTG  
TTTTCTGTCCTTATCATTTTGCTTTTTCCAGGATGTTGTATATAAGGAATCATGCAGC  
ATGCAGCCTCTCGAGTCTGACTTCTTCCAGTTAGCACAGTTATTTAAGATCTATCCGA  
GTTATTGTGAGTAGCAGCATTTTTTTATTGCTGACTAGTATTTTCATCACATGGATGG

GCCACAACCTTGTTTATCTGTTACCTGTCAATGGATACTAAGTTGTTTCCAGTTTTTG  
GCAAATATGAATAAAGTAAACATTTGCATACAGATTTTTGTGTGGACACATGTTTTC  
AATTCTCTTAGGTAAATACTGAGCAATGGGATTGCTGGGTATATGTTAAGTCTATG  
TTCAGTTTTCTAAGTTCTGAAACAATTGGATATCTATATGCAAAAATACAAAATTAA  
CCTTGACTCAAACCTTGTAACCATACACAAAAATAACCTGAAAGAGATCACAGGTGT  
AAATGTAAACCTAGAACTAAAACTTCAAGGAGAGAAACATAGCAGAAAATATTTG  
TGACCTTGCATTAGGCAAAGACTTCTTAGATTTGACATTTGAAACATGATACATAAA  
AAATCTTGATAAATTGGAGTTCATAAAAATAAGAACTACTCTTCAAAGACACTGAT  
AAGAGAATGAAAATACAAGCCACAGACAGAGAAAATATTTGTGAATTTCTTATCTG  
ATAAAGGGTTTGTATCCAGCATGCATAAAGACTTTTCAAACCTCAATAATAACAAT  
CCAATAAGAAATGCACAAAAGATACAAACACATCATCGAAAATGACCTATGAAAGG  
CAAATAAGCCCACAAAAAATTCTCAACATCATTAGACACTTGGGAAATGCAAATT  
AAAACAACACTGAGATAAACTACATATCTATTAAATGGCTACCACTTTAAAAACCTG  
TCAAGTGCCAGCCAGAATGTGGAACAAGTAGGACTCTCTTACATTGCTAGTGGGAA  
GGTGAATGGTACAGCCACTTTGGAAAACACTCCGCAGCTTCTTATAGTTACACATAG  
GACCTGGGGGTAGAGGATGGATTGACTGTAAAGGGGCAAACTTCCTGGTAGGGGT  
GGGGAAAGTTTTTLAGAAGGGTGAAATTGTTCTATATCTTGATTATTGTGGTGGTTAC  
ACAACTGTCTGCATTTGTCAAACTCACAGAACTGTACACTAAAAAGGTATATTTTT  
ATGCTCTGCTAATTTTACTTTAATCTTAAAAATAGGAAGGAAAAATAAAATCAATG  
CCACTGTGCGACTTTGGGCAAGTTACTTCACTTCTCTGTGCCTTGGTCTTTTGAAATC  
TATACATTAAGGATAAAATAATACCTTCCTCATACTGTTAGAATTAATGTGCTAAT  
TTATGTTTTATATATATAAAGTACTTGGCCGGGTGTGGTGACTCACACCTGTAATCCC  
AGCACTGTGGGAGGCCGAGGTGGGCAGATCACTTGAGGACAGGAGTTCAAGACTAG  
CCTGGTCAACATGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCTT  
GGTGGTGCCTGCTTGTAAATCCCAGCTACTTGAGTGGCTGAGGTGGGAGGATCACTTG  
AACTCCAGAGGTGGAGGCTGCAGTGGGCTCCACCCACTGCCTGGGTGACAGAGCTA  
GACTCCATCTCGAAGAAAAATAAGTACTTGAAACATAGCAAATGTTTTATAATTAT  
TGGCTTTTTTTTCTTATTGTTATTACTTGCATTATTGCTGTTTGAAGAAGTTTGGTGAT  
AATGGAGAGAAAAGGGCAATTAGGGGTCTGGGATGGTTTAAGTATGAGGAGACCG  
AGACACATTGACTCAGAGTGAAGAAATCAAAGATAAGAGAATGAAAGAAAGGGAG  
GGTAATTCTGAACGCACAGACAAAGTTATGTTACTAACGTGGCATCGGCTGTGTGTT  
GTAATAAATAACTCCCTTTCCTTGTCAATAGCTAATCAAATACTTTCTGGAGACCA  
GAAGTGAATTGCTGGATCAATGACAACCTCCTCCACAGATCAAAATGTTCAAATCCTT  
TTTCTGTGTTGTAATCCTAAATCTAAAAGAACAGAGAGACCAAGCAAATCTACCTCC  
CAACATCATTAAAGTGACAACCTCTCAGTATTTATTTGAATGGTCTGCTCTCAGCTTCA

ACCAAGGAAAAGTCAAATTAGTGTTGGTCAGAAAACAGAAGGGTGTACGAGAGTT  
CTGGCTGGTCATTACAGACTTGGGGATTTTTGATTAAGAAGAAGAAGAAGA  
AACCTGATAAAGTGTAATATAGCAAGCAGGGATTAGTGTCCTGCTGGGTCATGTTC  
TCACAACAGTGAGAATTCAGAGATTCATAAGAATTAACCTGCTCCACATGACAAT  
TTATTTTACCTTCTGGCTTTTCCAGGAGGCAAATCAGTGCAACTTCTTTCTGCCTTTG  
TTTCAATTTGGTAACAACCCTCAATTTTAGGACAGGCTAAACCTAGCCACCCTATCA  
GAGATGATGAAGTAGCCATCTTTTTAACAGGTGGGGAGATGAATGGAATCAGGGTT  
TGTTTGTGTTGTTTAAATAACTGCTAGTAAAACCAAGTCAATAGCTGACTGAGT  
GTAAGGGAGGCTCCAGAAGGCAGGTTATTGTAGTATAGATGTGACTCGACTTATGA  
TGATGTTACTTCCCGATAAACCCGTCATAAGTTGAAATATCGTTAAATTGAAAATGC  
TTTTAATACACCGAATCTACCGAACATCATAGCTTAGCTCAGCCTACGTTAAATGTG  
CTCAGGACGCACATTGCCTACAGCTGAGCCAAATCACCTGGCAACACAGGACACTG  
TAGAGTATCGGTTGCTGGCCCTTGATGCTGTGACTGACTGGGAGCTGCGCTTAGT  
GCCTCTACCCAGCATTGAGAGTTTCTTATCGCTTATTACTAGCCTGGGAAAAGACCA  
AAATTCAAACTCAAAGTGCGGTTTCTACCGAATGCTTATAACTTTCAGACCATCAT  
GATGTTGAAAATCGAACCATCGTAGGTTGGGATCCATCCTATAAGACGAGCTACA  
CTGCCGGAAGTGTAAGACTGCTATGCTGCCGGAAGATGGGGCATAGTGGACAACCTG  
CAAGTCCTGACAACAGGAGGTCAGCATCTGCGACCTTTAACATCCACATTGACACTA  
CCACAGTCTTCCAAACAGAGCTGATGATATAGTTTGGATGTCGTCCCTGCCCAAATC  
TCATGTCGAATCGTAATCCCCAGTGTTGGAGGTGGGGCCTGGTGGGAGGTGATTGG  
GTCATGGGGGCAGAGTTCTTATGAATGGTTTAGCACGGTCCCCCCTTGGTACTGTAT  
AGTGAGTGAGTTCTCATGCGATCTGGTTGTTTAAAAGTGTGTGGCACCTCCCCTCTCT  
CTCTTTCTCCTACTCTGGCCATGTGAAGTGTTGGCTCCCGCTTTCCTTCCACCATGA  
TTGTTAAATTCCCAGAGGTCTCCCTAGAAGCTAATGCTGCCACGTACAGCCTGGAGA  
ACTGTGAGCCAATTAACCTCATCTCTTTTTAAATTACCCAGTCTCAGGCCGGGGCGC  
GGTGACTGACACCTGTAATCTCAGCACTTTGGGAGGCTCAGGCAGGAAGATGATTT  
GAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCATCTCTACTGA  
AAATATAAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCGGGTGCCTGTAATCCCAGCTACTTGGG  
AGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTGGGAGTCAGAGGTTGCAGAGAGCCAA  
AATGGAGCCACTGTACTCCAGCCTGGGCAATGGAGTGAGACCCTGTCTCAAAAAT  
ATATATATATTACCAGACTCAGGTATTTCTTTACCTGAGACTATGAGAGAATGGAC  
TAATATAGCTGAAGAATTTTATTTTATTTTAAAAAACTTTTACGTTTGGGGGTACCT  
GTAAGAGTCTGTTACATAGGTAAACTCCTGTCATGAGGATTTGTTGTACAGATTCTT  
TCCTGCTCCTCCCCCTCCTCCCACCCTCCATCCTCAAGAAGATCCCAGTGTCTGTTGT  
TTCCTTCTTTGTGTTTCGTAAGTTCTCATCATGTAGCTCCCACGTATAAGTGAGAACAT

GCAGTATTTGGTTTTCTGTCCCTGTGTTAGTTTGCTAAGGATGATAGCCTCCAACCTCC  
ATCTATCTTCCTGCAAAAGACATGATCTCATTCAATTTTTATTGCTGCATAGTATTCCA  
TGGTGTATATGTACCACATTTTCTTTATCCAGTCTGTCATTGATGGGCATTTAGGTTG  
ATTCTGTGTCTTCAGAATTGTGAATAGTGCTGCAACGAACATTCGTGTGCTTGTGTCT  
TTATAGTAGAATGATTTCTATTCTTCTGGTAGTAATGGGATTGCTGGGTCAAATGGT  
CGTTCTGCTTTTAGCTCTTTCGAGAATCACCATACTGCTTTCACAGTGGTTGAACTA  
ATTTACACTCCCCTAACAGTGTATAAGTGTTCCCTTTTCTCTGCAACCTTGCCAGCC  
TCTGTTATCTTTTGACTTTTAAATAAAAACCATTCTAATTAGTGTGATGGTATTTTCAT  
TGTTGTTTTGATTTGCATTTCTCTAATGATCAGTGATGTTGAGCTTTTTTTCATGTTCCG  
TTGGCTGCAGGTACATCTTCTTTTGAAAAGTGTCTGCTCATGTCCTTTGCCACTTTT  
TAATGGGGTTGTTTTTCTCTTGTAATTTAAGTTCCTCATAGATGCTGGGTATTAGAC  
CTTTGTCAGATGTATAGCTTGCAAATATTTTCTCCATTCTGTAGGTTGTCTGCTTAC  
TCTTTTGATTGTTTCTTTTACCATGCAGAAGCTCCTAAGTTTAATTAGATCCCATTTG  
TCAATTTTTGCTTTTGTTGCAATTGCTTTTGGTGTCTTTGTCATGAAATCTTTGCCAGG  
TCCTATGTCCAGAATGATATTGCCTAGGTTGTCTTCTAGGGTTTTTATAGTTTTGGGT  
TTTACATTTAAATCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTGTGTTTGGTGTAAGGAAGG  
GGTCCAGTTTCAATATTCTGCATATGGCTAGCCAGTTATCCCAGCATTATTTATTGAG  
TAAGGAGTATCTCCTCCGTTGCTTGTTTTTCCCAGGTTTGTGGAAGATCAGATGGTTG  
TAGGTGTGTGGCCTTATTTTGGGGCTCTCTATCCTGTTCAATTTGGTCTATGTGCCTGT  
TTTTGTACCAGTACCATTCTGTTTTGGTTACTGTAGCCCTATAGCATATTTCAAAGTT  
GGGTAACATGATGCCTCCAGCTTTATTCTTTTTGCTTAGAATTACCTTGCCATTTGG  
GCTCTTTTTGGTACCATATGAAGTTTAAAATAGTTTTTTTTCTAGTTATGTGAAGAAT  
GTCGTTGGTAATTTGATAGGAATAACATGTAATGATATTGATTCTTCCTATCCATGA  
GCATGGGATGTTTTTCCATTTGTTTGTGTCTTCTCTGATTTCTTCAAGCAGTGTTTTGT  
AACTCATATTGTAGAGATTATTCACCTCCTTGCTTAGCTGTATTCCTAGGTATTGTAT  
TCTTTCTGTAGTAATTGTGAATGGGATTGCTTTTCTGATTTGGCCCTCAGCTTGGTAT  
TGTTGGTGTATAGGAATGCTAGTGATTTTTTGTATCCTGAGACTTTGCTGAAGTTATT  
TATCAGCTGAAGGAGCTTTTGGGCTGAGACTAGGGGGTTTTTTAGATATAGAATCAT  
GTTCTCTGCAAACAGATTTAGTTTGACTTCTCTTCTTCTACTTGGATGCCCTTTATTT  
CTTTCTTTGCCTGATTTCCCTGGCCAGGACTTCCAGTACCATGTTGAATAGGCGTGG  
TGAGAGAGGGCATTCTTGTCTTGTGCCAGTTTTTCCAGGGAGAATGCTTCCACCTTTTG  
CCCATTACGTACGATGTTTGTGGTGGTTTGTGCATATATGGCTATTATTATTTGAGGT  
GTGTTCTTTAATACCTAGTTTATTGACAGTTTTTAAACATGAAGCAGTGTTTAATTTT  
ATTAAAAGTCTTTTCTGCCTCTGTTGAGATAGTCATGTGGCTTTTGTCTTTAGTTCTG  
TTTATGTGATGAATCACATTTGTTGATTTCTTATGTTGGACCAACCTTGCATCCCAG

GGATGAAGCCTACTTGATTGTGGTGGTTTAGCTTTTTGATATACTACTGGATTCAGTT  
TGCAAGTATTTTGTGAGGATTTTGCATTGATGTTTCATCACGGATATCGGCCTGAA  
GTTTCTTTTTTGTGTTGTCTCTGTCAGGTTTTGGTATCAGAATGATGCTGGCCTCCTA  
GAATGAGTTGGGGAGGAGTTCCTCCTCCTCAATTTTTTTGGAATAGGTTCTGTAGGA  
ATGGTACCAGCTCTTCTTTATACATCTGGTAGAGTTTGGCTGTGAAGCCATCAGGTC  
CTGGGATTTTTTAGTTGGTAGGGTATTTATTACTGATTCCCTAAATAGACCGATAATG  
ATTTAGAAAGTGGAGTCGGTTTTTTCCTGGTCCAGTCTTGGGAAGGTGTATGTATCC  
AGGAATTTATTTAGCTCTTCTAGGTTTTCTAGTTTGTGTGCATATGGGTGTTTCATAGT  
AGTTTCTGATGGTTGTTTTTATTTCCGTGGGATCAGTGGTAACATTCTCTTCATCATT  
TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGCCAGGCTG  
GAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCACGCCAT  
TCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCTACCACGTCCGG  
CTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCGTGTTAGCCAGGATGGTCTC  
GATCTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGG  
CGTGAGCCACCGCGCCCGGCCATTCTAATTGTGTTTATTTGAATCCTCTCTCTTCT  
CTTCTTTATTAGGCTAGCTAGTGGCCTATCTATCTTATTAATTTTTTCAAAAACCAG  
CTCCTGGATTTCTTGATCTTTTGAATGGTTTTTCATGTATCAATCCTTCAGTTCAGCTC  
TGATTTTGGTTATTTCTTGTCTTGTGCTAGCTTTGGGGTTGACTTGTTCTTGCTTCTCT  
AATTCTTTCAGTTCCTGATGTTAGTTTGTAGTTTGTAGATCTAACTTTTTGATGTGGAC  
ATTTAGTGCTATAAATTTAACTCTTAACACTGCCTTAGCTGTGTCCCAGAGAGTCTG  
GTATGTTGTATCTTTGTTCTCATTAGTTTGA AAAA ACTTCTTGATTTCTGTCTTAATTT  
AATTATTTATCCAAAGTCATTCAGGAACATGTTGTTTAATTTCCATGTAATTGCATGG  
TTTTGAGCGATTTTCTTAGTCTTGACTTCTATTTTTATTGTACCGTGGTCTGAGGGTGT  
TTGATATGACTTTGGTTCTTTTGCATTTGCTGAGGATTGTTTTATGTCCAATTATGTG  
GTTGATTTTAGAGTATGTGCCATGTGGTGATGAGAAGAATGTATATTCTGTTGGTTTT  
GGGTACAGAGTTCTGTAGAGGTCTATTAGATCCATTTGGTCCAATGTTGAGTTCAGA  
TCCTGAATATCTTTGCTAATTTCCCTGCCTCCATGATCTAATACTGTCAGTAAAGCACT  
GAAGTCTCCTACTACTATTGTGTGGGAGTCTATGTCTCTTTATAGGTCTCTAAGAACT  
TGCTTTATGAATCTGGGTGCTTCTGTGTTGGATGCATATATATTTAGGATAGTTAGAT  
CTTCTTGTTGAATTGAACCCTTTACCATTATGTAACGCCCTTCTTTGTCTTTTTTTTTTC  
TTTGTGGTTTTGAAGTCTTCTTTGTCTGAAATTAGGATTGCAACCCCTGCTTTTTTTCTG  
TTTTCTGTTTGCTTGGTAGATTTTCCCTCCATCCCTTTATTTTGGACCTATGGGTGTCT  
TACATATTTTATCTTTATCTATCCATCCAGCCATCCAGCCATCCATTCATCCGTATCA  
TTTTTAACCAATAAGGACTTTTAAAAGCGCAACCACAACACCATTAACATAACCAAT  
AAAATCTATAACAATGATAAAATATCATCTAATACTCAGTCCATGTCCAATTTTCCC

TCGCTATCTCAAATCGTCTTCTTAGAAATGGTCTGTTCAAATGAGATCACATGGAC  
AGAGGAAGGCGAACCTCACACTGTGGGGACTGTTGTGGGGTGGGGGGAGGGGGGA  
GGGATAGCATTGGGAGATATACCTAATGCTAGATGACAAGTTAGTGGGTGCAGCGC  
ACCAGCATGGCACATGTATATGTATGTAACCTGCACAATGTGCACATGTACCC  
TAAACTTAAAGTATAATAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAGTGAAAA  
AGAAAAAAGAAATGGTCTGTTCAAATCACAAACCAGATTCAGAAA  
CAATAGCCATACATTACATTTTATTAATATGTCTCTTAAATTTCTTTTAATCTATTAC  
AGTCTTTGGAATTTTATGTCTTCGTTTATCCTTCCAATTATTAAGTATTT  
TTGTATTCAATTGAATAGACAATGCTTGCAGAAAAGTAAAAAATAAATTTAGTA  
CAAAAAGGTACATAGTGAGCTGTTCCCTTAGTCTCCCTCCCAGAAGCAATGTTACCA  
CTTTTGTACAAATAGTCTCTGCCTAGACACACATGCCAGTCCCTAAGGTGGCTGTAA  
CAAGGTGGTTAAGAGTGAGAACATGAATTCAAATTCCTATTATGCCACTCACTAAGT  
ATAAATCTTGGTCATGGTACATGCCTCTGTGCCTCAGTTTTTAATAATGGTACCTACC  
TCATAGGGCTGTTGAGAGAATTAATCAGATAAGTGCTTAAATAACTATTAATTT  
ATTATTATTCACATTCCTTTTGGCTTTTTTCCCAAATAGCAGAGTGGTGCACATATG  
TCTTCATTTATTTGGCTTGTTTTTTCACCTCACATCACATTTTGATGAATAATTCATA  
CATGTTGTTATAGATTTGCTTCATTCTTTGTAATCATTGACTAATATTCATTGTATG  
AATATGCTACTGCTAAACATGTACGTTATTTCCAACCTCTTATTATCAAGAAATGCT  
GCAATGAATATCCTTGTAATACTTTAGTGGATTCATGTGCAAAAATATTCATAGGAT  
AAAATCCTGAAAGTTAAATTGCTGAGCTAAAGGGTATGTGCATTTTAATGCTTTATA  
GATTGCCAGCTGCCTCAAAGGAGGTTATAACAATTTACACTCCAAGAAAAATGC  
ACAAGGGTCCCCATTTCCCACATACCCTAGCTAACACAGGATATTGCTAAATGCTTTC  
ATCTTTGTAAACATGATGTATTGAAAATGGTATCTCAAAGTTTTAATGTGCATTTTTC  
TGATTGTGAGAAGATAAAGGAAATGTAGTACAACATAACATCAGCAGTCAAATGAC  
CTGGCCATGACTCCTGAGTGAGGACACTGGTAAACACCATCAGGATCCAAACACCT  
CTGTATTTACGAAGAGGATGCTCCCTATTGGATAGCACTAAGCTTATTTTCATGTATG  
TACATATGTAGTTAGTTAATTACATCCAGCGGTGGCAAAGGGCTTGTTCTGACCCAA  
TGAAACTTTCTCTCCTGGCCCCCTTCCAGCATGTGGTCAGGAGTAGAGTGTTGTGGC  
CATGAGGCATGCATTTGTACAGATGACTACTCCTCCTTGAAACATTTTTTTCCA  
TTTGCTTCCCTGCTGTCTCACTCATGGGTCTGCTCCTAATTCACAAATCACTCTTTTCC  
CAGTCTTCTTGGTTGGGTTTTCTCCTCTTCTGTGCTTGTAGACATGGGGGAGCCCCAG  
GGCTTCTCTCTTGAACACTACAGCTTCTCCCTGGGTTCATCTCCTTGGGATGTCTGTTC  
AATGGGTTTAAATACTAGGGCTAGGACTAGGGAGAGGTCATTGAGGCACTTAGCAC  
ATAAAGTTTAAGGAAACATTCTTTATCAGGCCCATGCAAGTGCAGGACTGGCCCTGG  
AGGGTGACTACCACCTTACCTTTTCCACCCTAGGCACCTTGTTTGCCTTACCCTAGCC

CCAGTCCTCTTTAACACCCCAGTCTTCTCCCTGGACCTCCAGAAACATAAATCCTATT  
TGACATTTCTACTTGGAGGTTTTAAGGTAACCTCAAACGTAAAATATCTAAGACAGAA  
CTCTTGCATCACTTCCCATCCTGGGGCCCAAGCCTGTCTCTTCTACTAGTCTATCTCA  
GTAAACAGCATCACCATTTATTCAGTTGCTCAGGACAAAAAATTTGAAGTAATCCTT  
GACTCTTCTTTTTTTTTTTTTGAGACGGATTCTCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGC  
AGTGGTGGGACCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTCCT  
GCCTCAGTCTTCTGACCTCGTGATCCACTCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATT  
ACAGGCGTGAGCCACCGCACCCGGCCTGGATTCTTTTTTTTTTTTTTAAACAAGTCCT  
ATCTTCCATCTCCAAAATGTATCCCAAATCTGACAACCTCTCCACCGTAGGCCAGC  
CCCCATCTCTCCCCTCTGAAAATAGCCTCCCTTAGATCTCTGGACATTTGTTCTTCCC  
CACCCCTTGTGATCACTATTCAGCATTGAGAATGATCTTTTAATATTATGAAGGAG  
ACTGTGTTCTCTCCTACTTAAAATTCTCTAGTGGCTTCCTAATAAATTTAGAATAAA  
AAGCCAACTCCTCGCCATGGTCACCAGGCCAGGATCCAGTGGGTACAACAATCTGTT  
CCCAGCACAATAATCCCACTTCTGCCTCCCCACCATTACCAGGCTCCACTGCACTG  
GCTCATTCCCTGCCTCAGTTGTGCTTCTTTCCCTGGAAAGTTCTTTCTGTAGATCTTTA  
AAGGGTGATTTCTTCTCAACATTCAGGTGTCAGCTCGTTTCACTTTCTGACCATGC  
CCATCCACTCAGAGATCACTCAAATCCATTACCCTATTTTATTTCTCCATCATATG  
TATCACTATCTGAAACTATCTTGTGTTGATGCAGGCTATTTTCTTGACCCCTTCATG  
GGACTCCCAACAGGGGTACCCATTTACTCAGCCTGCCCTGCTCAACCTCTTGCAGG  
AGGGAGCACACGAGTGAACGAGTGCAGGAACCAGCTGGCTGCTTTAGTGCTGTGAG  
GAGTAAACTCCATGCAGGCCCTGCAGCAGCAACCAGGTAGGGGTGCCTGCAACCCC  
AGGGCCCCAGAGGGTGTGTTACAATGCTCTCGTAGCTCTGCCATCTGTGGACAGCAG  
TGTGTTGTCAGCTCAGTGGGCCCTTTGCTTCATCATGTAGGGTGGCTGCCCTCTGCCT  
GTGAGGGCAAAGGGCCAGGGTGACAGTCTTTTTGGGTACCCACAATTTGTGCATCCT  
GAATTCTTGTGTTGGTGCCCAAGAAGAATGGGGTCACACAGATGAACTGAAGGATGG  
TGAATGCAGAGAATTAGCAATGAAAGTGGCTCTCAGCAGAGAGAGAAGCTGAAAA  
GGGAATGGGAAGGGCAGGTCACTCTCCCCTGAAGTCAAGTCACATCTCTCCAATGTC  
CAGCCACCATCTCTGAAGTCAAGTTTCTCTCTCTGATGTCCAGCCACTTCTCCTCTC  
TACTGGCTGAGTCTGGGGTATTTATAGGCAGAGGATAGGTGGTGGGGCAGGCCATA  
CATAATTTTGGAAAAGGCAACATTCTATTGGTAAAAAGACATTATTCATAAAGAACC  
AATTGGGAAAGAGCGGGCACACAGGGATGGAAGTTCTCACTTTGGGCTGCAGGTTT  
CAGGCTTTTCAGCTCAAAGTGAGGTTTTTCCAGGGACCTGCCCCGTCTGCCTAAAA  
TTTCTACACTTCTGTCATTGATACCGCTGGATAACAGCTCTCCTATAAAGTTCAGGG  
GCTTAAACAAAAATTTACTAATTCACCCGGACAGTTCTTGATAGGGTCTCTCCTAA  
CTGTTGCAGTTACATAGCAACTGGGTTGGAGTCATCTTTTCTGGGCTTGACATCCAG

GACAGCTTCTTCCCTTGTGTGTCTGGTGCCTCAGTGCTCCTCCAGGCAGCCTTTCTCT  
CCAGAAGAGTAGCCTGGACTTCTTGGCAACTCAAGCTTCCAAAAGAAAAAAGCA  
GAGACTGCTGGTTCTCTTATCAAACAGGCCTGGAAGTGGCACAATGTACTTCTGCTG  
CCATATTCAGGAGGTCAAAGCAATCGAAGGCCAATCCAAGTTCAAAGGCATTGGAG  
AAAAATGAGAAGTGTCACTTAAATGAGAAGTGACACATGCGTAAAAGGGGGAAAA  
GCATTGATTGTGGCCATTTTTGGAGATAAGCTATCACGTTTATTTGTTTGTGTTTT  
CTAATGGTCTGTCTTCTCCCATTAGGTTATAAGCTCTGTGAGACAACAGGAATCTTG  
TCCATCTTGTTTTATGGCTCTACTTCCAACACCTAGAATAATGCCTGGCACATAGTAG  
GTGCTCAGTGAATAACTTAAGCACTTGATACATGTTTGGGGAAGTAAAATGAACAG  
AATTAAGTTCCTCCAGATTGGTCTGCCAGATTTGCTGATGCCAAGCATGCTGATGC  
CTCACCAGATGAAAGAAGCCCTAAAATGTAGGGTTTCGCTTCTCTGCAAACAAGA  
AAAAGTTCCTGACACAAAATCTAGAAATAGATTTGGCGTGTGTTTTCTACATTGAA  
ATATTTCCCGTAGTACCAGAAATTATTTTCCACAGCTTTGTGCTACATTAATAATATT  
GAAGTTGACTGAAAATATCTCCATTCTTTAATCTTGGTGTAGACTAGAAACAATTTT  
TTTGTAACAAAGTAAATATGAAAAGTTCCTAATATTTGAACTCCCGATATCCCA  
GATATCTCCAAACTTAAAATATCATTGCAAGTTAAGATAAATTTTTTTAAATGACTA  
CCGAGAAAGGTCATTAAGGCTTGGTTATTAATAATGTACAGATTTGGGTTATAAAGC  
CAGAACTTATTTGTTTAAATCATTACATATGACCAAGCACAGAAAATAAATTACCTC  
AAATCTCCTCTTTGCTAATTTTTACTGGTAAACTCTATAAAATGATCCTATCTTTAA  
CCTTTTTGTAAACCCCTTATAAGTTAGTAAGTGAGAATGTATTCATCAGAAGGATTT  
TAGTGATGTTTGAAATTAAGAGAGAGATTTGATTTTTAAATTATACTTGCAGAC  
TACTGCTAATGAACTTCTTCTAACCTAGTTTTGTCTTATCTTCAGTTTTTCCAGATT  
TGCTCAAAGCAATCCAGTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTTCTCTGCCATCCT  
TATTGTGTTAACCATGGTGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACC  
TTTTGAACTCTGCATGGTCCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTCCAGGTAAG  
TACAAAATTCTACCTCTGAAGACAAATGTGCTTTTCAATATGTCAAAAGACCGTCT  
ACCTAAATATAAGTTATAATCTTAACATATATACATGGATGCACACTGTAGTATTA  
TACATAATAACAAAAGTGTGGAAATACCACACTTGCTCAACAGTAGGGAATTCAA  
TAAATACTTTATGGACATCTATATGAATAACTGTGATGCTGACATTAATTATATTTT  
TGAAGATGTAATCAAGAGGATAAACGCTTGTCTCAAAAAGTTACATGGGAAAAGCA  
GTATGTAACTTATATAAACATTGTGAACCTAATTTGATTATATATATAAAATATAG  
GGAATATACATATAAAATACATATATGTATATATGGGGGCTATATATATATATAT  
GAAAGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGACAGACAGACAA  
TACAGACTCCAATCTGTTGGTCGTGGTTGTCTCTGACCCATGACACTATGGGGGACT  
TTTATTTTTGCTCATACTTTTCAATATTTCTTAGTGTTCAATAATGTGCTATTATTTAT

ACATAATAATAAAAATAAATAAATGGCATCAAAAAGAGTAAAGGGCCAGTGTTCC  
GCCACATATGAGCAGCCATATTCAAGCCTGTAGACACTTTGTGTAGCCTAATGCTA  
GGTGTATCTGGGCAAGGATAAACTCTAAAGCCAGAAATTAGTTCATCAATAAACAT  
GTGCTACTCAATAGCTAGGGCTGATGGAAAAGAATATAAAACCCAGTCTGTGCCAA  
ATGGTGCTTACTATCTGCAAGTGGGAGAAGGAGAAAGACGAGAAAATGAAAATGT  
GTGTATAATTTATATGTAGCTGTTCTGTAGGAGATCTCTGACTTCACCCCATTTCTAAC  
TTTGCAAAAAGATCCAACACTTTGTCTAGATTCTCTGGGAGGCAAGTAATTTTATTGAT  
GGTTTCATGGAGGGATACAGAACGATAACAACCTCACACAAAGCAAACAATGTAATG  
AAAATCTCTATTCGACTGTTTCTTTTTCTCTGAAGTTGCCCTTTGGCTGCCAGCTAC  
CAGGCACCAGGCTCAAGGTACTTTCTTGCTCTTGACACTACTCCCTTCTCTCATACAA  
TTCAACCCCAACCACAAACGTGTATAGATCTCTCTCTCTATAAAACAAAGGCCTGTA  
GTTAACAGGAGGTCACTTGCAGTGTAGCCTCTGTTCAATTGTTACTTGTGCACACTGCT  
TAGGGTCTCACCCCATCCACATTCTGCTAATCACATTATTCACCCATCCAATGTAGAT  
CTCTCCAGTGGAGATTCTGCTAATATTTTCTTTAGATTTGTCACAAGTATATAATACA  
GTTTTAAATTGTACAGATGATTATCCTATAACAGAAGAGTCTAAGCCTTTTACATCTT  
TGTATCTCTAACGAAAGCATTTCAGCATGAAGCTCTGTACACAGCAGACAATTCAATA  
TGAATTTGCTGACTTGAAACAGCAAGCCTAGAAAGGAGATGTTAACTTGGTCACTTA  
GACAGAACAGGTTTCAGCAATCAGAATTCAGATGACATGGAAGTGGTAGAACAGGC  
GCTTTGAAGCAATAGGACATGAGCCAGTGAGGAGAGGGATGGAATATCATAAACAA  
AGGCCAAGGGCTTTGCAATCAGAGCTGAAGAGCCAAGAGCACAGGCTCAGGGTGTG  
GGCAGACTGAATGAGAAAGTGATTCAATCACATGTGAAAGTCCAGATGAGAAGAGA  
GAGTTGGGATTACTTCTGCTCACCAAACATCCAAAACCAAACAGGTGGATCCGGGT  
GGTGTGCTGTTTTACTGATGACCATTACACAGAATTTTAAACAGAAGGAATGTAAAGC  
AGTGGTTCTCAAACCTGGAGTTCCAGATGAGCAGCGTCTGCATCATCTGGAAACCTG  
ATAAAGCAGCAAATTCTCAGGCCCTACCCAGACCCACTGAATCAGAAACTTGGGG  
GTCTGGGGGAAGATGGCCATCTGTATTTTAAACAATCTCCCTTCAGGAGATTCTGAGG  
CTGGCTCAAGTTTGAACCTACAGGTAGTTGGTTCAACAGGTGTTGGTGGACTGACAAA  
CAAAAAGAGACTCCGAGGTAACCTCAAGATGGTAATGTCAGAAAGCAGCTACCACC  
CCTAGGGCTTGGGGGAACCAACAAAAGAGTTTGGCATTGCCAGAACCTAGAATCTT  
GAGGAGAGGCCCCAGAGCATTGTGTCTCAGACCTTGAGGACTTGGCACTGGGACAC  
CATGAGGGGTTTCTGGGTGTGGGAAAGGGCTGGAAACTCCCCAGTTGCTGCCACCA  
GGGAGAACTACAAGTGAAGTGAAGGTGTGGGCCTTTCTCCCTTTTCTTTTCTCGTC  
TTCTCTCTCCCCCTGGTGCTCATGTTTGACAGAAAACAGCTGAAAAGGCAGAACTAG  
TTTGGGGAGTCTTGACCTGGCATCATAAAGCAGAGAAAAGCAAAGCTGGAGTGAAG  
GTGAGACACAACAGCTCATTAGCAGCAACAGCCGTCTAGCGCTCCAGCTTCTGAAT

GAAATTCTGAAGAACAGCGCACTTGGAAGACAAATTATTTGACAGTTCTGACAGAC  
GACCAAACACTAACAGCATTGAAAAGCAAGATGACTCAGAGAATACAGAATTTAATC  
CAAATCCCAGATCCTATCTCTGCCTTTGGCCAGGCCTAATGCAAGGAGAACCTGAGC  
ACACAAATATATGCAGGAATGATCAGGACCTGTGCCTGCATTCTATTCTGTCTCACC  
CACCTTCAAATTTGTTGTAAAAACATGGGCTCAATAAAGGTTTGTGAATCAGGGAAG  
GAAGAGAAGGGGAGAAAGGAAGGAAGGAGCCAGCTCCAGATCTGTGTCTTGCAG  
AGGATAAAGGCCAGTGTTTTTAGATCACCCAGTGTTTTTCTAAGCCCCCAATACTTA  
TTTTGAAATATCAAATGTTCAATAACTAAAAAAAAAACCGTTACAACAATAAAAC  
ATGTTTGAGGGTCAGATGGACTGGCAGTTTGTGACCTCTGGGGATAAACAGGTCCT  
TTGGAATCACAGACTTCCTCATTCCCCTTAAATCTCATATGGTACCCAGAAGCCCTT  
GGAACCTTGGAAAGGTGTTTATTCACAGTTGTAATGTCCATGCAGACCCTGGCTCTAA  
GACCCAATTGTGTAAGGGTAGGTTTGTAGCCCTTATCCCAAACATTCTAAGTGTGAG  
CCAATGCGTCACACACTCAGAGGCCAGAGACTGTATTGGGGTCTTTTATTTACAGTA  
CGAGTCACATTCCATTAAGAGACCCCAGAAGTCAGCTCTCTTCCACTGACTGGTTCT  
CTTCCCTTGTTTCTCTTGCCAATGTGTGCTGCCAGGTGGCAGTGCTCACTGTCAGCA  
GAGAAGAAAAATGCTTTCCTCCTTGGACCTCTTTTCTCTTTTTCTCCTCCCTACTCAC  
ATTCAGGTTCCCTAAGCTTCCCCGCTCCTTGTGCTGAAGTCATTCTATGGTCATTTCT  
TCAACTGTCTACTTCCCTGCTGGATGGGCACCCAAGACTTGGCATCCTGGGGCATGT  
AGAAAGGGGAAAGGGAAGGGAAGGGAAAAGAAGTCCTCCAATTGTCTATCTGGA  
CCTTTCCACACTGCCAGAGTACTGCTATGGGCATCTCCTTATGTCTCCCGATGTGGT  
GCATGCCAGACCCTGCAGGTAGAAAAGGAAAGAAAGCAACCCATTGGACCAGGCC  
AGCAAAGGCTTCAGTCACACAGCTGGCTCATACTTATGGCTTCATATTCTGTTGCCT  
CTTGAACCAGACATTTCTTCCACTCTCATAACCTCCAGTTTAGCTCGTATTCCTCAGC  
ATTCTCCATGTAATATTGTTGCATGAAACCCATGCAAGTCAGCCAATTTGCTCTTTCT  
CATCTTGTCATTTATAAATTGATGCTGAGAAGTCTTTTTCCCAAGGTTTTTAGTAATA  
CCTTCATCATCCCCATAGTTCATTTTGGGCAGTGATTCGCTTCTTTGACTGTACATT  
AGAATCATCTGAAGAACTTTCTAAAACACTGATCTCAGGTCTCACACAACACTAAT  
TAAATTATAGTCTCTGGTGGGGTAGGGCTTGGGCACTGCTATTTTACCTTAAGCTCTC  
TGGAGTCATTCTAATTTGTAGCCAGTGCTAAGGGTTGCAATATAAGTGAATATATTT  
CACGTATTTGTCAAACATTGACTGAGTGCCATTATGTGCCAGCCATTATAATAGGC  
ACTGGTGATCCCACAGTGAATCAGGCACACAATGCTGTCTTCACGGAGCTTGTGTG  
TAGTGGGAGAGTCAAACAAAAGTGTATATCAATAATTAAGTGATTACAGATTGCAA  
TAATTACAATAAGGGTGATAAACAGGTTGCTATAATATAACAATAGTATTGCCTTTCA  
CCAGACATTTCTTAAAGAGGTAAATCATCTATCAGACACCTTTTAAAAATCTCATCT  
AATTTCAAAGGTGTACATAAATAATTAAGTGATTACAGTTTGAATAATTACAATGA

GGGTGATAAACAAGTTGCTATGAAAGAGAAAGATAGCAGAGATCTGGCTTTGAGAT  
GGTGGTCAGGGAAGACTGCTCCAATAGCTGAGTTCTAAAGCTAAGAAGGAAGTCTGAG  
AACCTTCACAGAACGTCCCAAGTAGAAGAGAAAGCACACTGAAGACTCTAGGGAAA  
GAGGTCTGCTTGTGTAGGAACCGAAAGAAGGCCAATGTGGCTAGGTGCTGGGTAG  
TGAGGGGAAATGGCACAAGGAAAAAATGAGGTTAGAGAGATCAGTTGATACCAGTT  
AATGTTGGACCCTAAACATTAACCATGGTAAGTCTTTTAGAATTGATTCTAATTGCA  
ATGAAAACCTTTTGAAGATTTTAAAAAGATATCTGATAGCTGATTTACCTCTCTAA  
GAAATGTCTGGTGAAAGACAATACCATCACATTGGAGATGGAAAAAGATGAATGGA  
TTCTAAAAACATTCTGAAAGTACATTCAAATGTTTTTCAGGTAGCTTATGCAACTA  
ATAAATAGTGGTGGCATTCTGGGTAAAGACAAGGGAGGAGCAGGCTTGCAGTTTAGG  
GCAAGAAAGGGGTGGGGAGAAGAGCTCAGCACTAAAATCATGTGTTCCATTTGGGG  
CACATCGAGTCTGAGTTGCTATGAGACCACCAAGTGGAGATGCCAAGTAAATAGTC  
AGTTACATGAATCTGGAGTTCAGTGAAGAGGTCTAGAAGAAAGATGTATATTTGGG  
CATTATTCGGATATAGATATTATGTAAAGCAATAAAATTGGATGAGATCACCTAGGG  
AGAGAATGCACATAGATAAAAACTGACCTAGGACCACTTCATGTCTAAAACACCAA  
AAGCAATGTCAACAAAAGCCAAAATTGACAAATGGGATCTAATTAACCTAAAGAGC  
TTCTGCACAGCAAAAAGAATCAGAGTGAACAGGCAACCCACAAAATGGAAGAAAATT  
TTCACAACCTACTCATCTGACAAAGGGCTAATATCCAGAATCTACAGTGAACCTCAA  
CAAATTTACAAGAAAAAACAACAACCCCATCAAAAAGTGGGTGAAGGACATGA  
ACAGACACTTCTCAAAGAAGACATTTATGCAGCCAAAAACACATGAAAAAATGC  
TCACCATCACTGGCCATCAGAGAAATGCAAATCAAACCACAATGAGATACCATCT  
CACACCAGTTCAAATGGCAATCATTAAAAAGTCAGGAAACAACAGGTGCTGGAGAG  
GATCTGGAGAAATAGGAACACTTTTACACTGTTGGTGGGACTATAAACTAGTTCAAC  
CATTGGGGAAAGTCATTGTGGCGATTCCCTCAGGGATCTAGAACTAGAAATACCATTTG  
ACCCAGCCATCCCATTACTGGGTATATACCCAAAGGACTATAAATCATGCTGCTATA  
AAGACACATGCACATGTATGTTTATTGCGGCACTATTCACAATAGCAAAGACTTGG  
ACCAACCTAAATGTCCAACAATGATAGACTGGATTAAGAAAATGTGGCACATATAC  
ACCATGGAATACTATGCAGCCATAAAAAATGATGAGTTCATGTCCTTTGTAGGGACA  
TGGATGAAGCTGGAAACCATCATCCTCAGCAAACCTATCGCAAGGACAAAAAACCAA  
ACACCGCATGTTCTCACCCATAGGTGGGAATTGAACGATGAGAACACATGGACACG  
GGAAGGGGAACATCACACACTGGGGACTGTTGTGGGGTGGGAAGAGGGGGGAGGG  
ATAGCATTAGGAGATATACCTAATGCTAAATGACGAGTTATTGGGTGCAGCACACC  
AGCATGGCACATGTATACATATGTACCTAACCTGCACATTGAGCACACGTACCCTAA  
AACTTAAAGTATAATAATAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAAACAAAAATTGATGT  
AGGACCAATTCCTGAAGAACACTGACAGTTAATTTTTTGGTTTAGGAGGAGGAGAA

GCCAGCAAACGACACTGAGTAGCAATATCCAAAGAAAAGAGGAAAAGGAAAAC  
TGGGAGATTATGAGTGTCCAGAGGGAATGTTTCAAGATTACCATCAGCAGTGAGC  
TTTGTGTAAAGGTGGCCTCCTGTAATAGAGGTGCGGGCAGGAGAAGGCAGAATAGG  
GAAAAGGGGGTGAAAAGCTTCCCTCAAGATTTATAATACAGTGGAAGAGAGAGAC  
AGAGAGAGAGAAAAGAGAAAGAGAGAGAGAGA ACTTAAGGAGGTAGAGGAAGAGA  
GAGAACCAAAAAGAGGGAGCTGAGTATAGAAGCAATTAGATTCATAGTTTTTGT  
TGCGGCAGTGATATTTGAGTGGGGGCCTTTTATATATTCCATTCTAGGTGTTCCAG  
TTGATGGGAGAGGGTCTTACCTAGATCTGCATGTAAAAGGGAGTAGGCCAGCTGGC  
AGACTTGACATGGATCAGTGGTAGAACATCCTAGCAGTTCTGTGAATACTCTCTGAG  
AATGACATGAAAGGTATTGGTTCAGGCCTTTTGGAGGTGATAAAAACCACCAAAT  
GTGGACTTATTGCAAATTGTATTTGTTACCATTTGCAATGATTATAATTATTCTCTTA  
TATATAGGCTTTCTTACATATAGCTTCTTACACATAGCGTCATGAGTTATGCCTTC  
TCTTACATATAGTGTCTGCTATGAGTTATGCCAAGCAGGGCAAACAAAATTGCTGCC  
TTTCTTTAAAAGAGGACGCTCCTAGTATGGGCCTAATTAATTATGATAATTACAGC  
TATGGCATGGAACATAAGCACATTCATATACACAAAGACAATAAAATAAAGAACAG  
TTCAAAAACAGAACAGTTACATTATATATCAGTTTCAGTATGAATAATACCCTGGAC  
TCTGAAATATGTCTGGGGCACATTATTCTGTAATTGGTGGTGAAAAAAAATCTGCAT  
CTTATCTCTACGCCAATCCTTATGAAGGAGCTGTTTTTCAGGAGTTTCGAGAAAGAGA  
CACAGGGATGTCCAGTCATCAAAGCCGCAGAGCCTGAGGAAGAATAAAGGATTTGT  
GGCAGGAAAACCCAGTAATGAATGTATTCTGCTAGTTTCTCAGCATAGA ACTTAGAA  
AAGAGGCCACAGAAGGAAAAGAGAAGTAATGTTAGACAGCTGATGTTGGCAATGG  
GCAAAGAATTTCAATTCTCATATGCAGGGCAGTGGCTAAAGGGGCAGTGTTGTGAGG  
AATCACATTCCAGGTCATTCATGTCCAGGGTGTGGTAGGAGGACTGTGTTTCATTTA  
TTTTGTACATGGCCAGCTATGACCTTGTGCAAGGAAATGCTTAATCATTTTCTATCA  
CAGTTGCAAAGAGATTCTTATCCTACTCAGAATGTACGTCTTCTCTTCTGTTTCATTT  
ACAGTCACAACCCAAGTCCTTGCTTTGACCTCCAAAGCACCACTTGATGTATCCACT  
TCAGAAACACACACAGACAGCTCACCTTTTCTATCCCTTACCTTCCCTCCCCTCTTCA  
CTCAAACCACCTACTTCCCTTGCATTCACTCTTCCCTCAGCCTGAAATAATCTTCCCTC  
CAAATATCTACCTTCTCACTCCCTCACTTCTCTCAAGATACTTAAATGTTATATTC  
CCTATGAGGCCTCCCCTGGCCATCCCTCCCCAGCCTTCCCTATCCCCCTCTCTGCTTT  
ATTTTATTCTCCTTAATATATATCACACTCTGATAAACCATTGAATGTACTTATCAAG  
TTATTGCCTCTCTCTCCCTTTCCATTGTCTCCATCACTGAGAGCTCTGTGAAGAAAAG  
GATTTGTACCTGTTTCATTTAGTGCTGTACCCCCAGTTCACACAACAGCGCAACAGG  
CACTCAATAAATAGTTGTTGAATAAGTGAATAAAAACAGAAGTAGCTGCATATTTTCT  
GGTAACAAATGATATTCTTCTGAAAATGTCATATTTTCAGACATATTTCCGAAAATA

AATTCAAATTAGATAAACATTGTATTTTTAGACCATTTCTTCTTTGCATTAATCATCC  
TTCTCAATAATATAACATTTGTAAAACCTTAGGTTAGATATGGGCTCTTCAACTTTCCA  
TTACAGAAGATAAAGTGAAAAGGCTAGACCCAATGGTGTATTTCCTTCATCTACATC  
TATCCTTTGGAAACACATGACCAAATTGCTTGCCATCACAATCTCAAATCTACCCT  
TTGGTATTAACCTCACTTCACTTGTCCCTCTGTCCCTTTTTAGATGGTAGCCATCGGTC  
TCTGGAGCAGTGTAGAGTCAGAACAACCTTCTATTTGGGGAAGAAATCATTGCTGGTG  
ACCTTACTTTCAATTACTAACTTTCTAGTGACATTTACATAATTTTAGAGAAAATTA  
CACCTACACTTGTAAGTTGTGGCTTTCCACACCTATTTATCATCTCTCAATATTCC  
TTGAAAAGGAAATTATCAATTTATCATTCTATATTGGCAATGAAATGCCCTAATAT  
CTGTCACCTATAAGACAATTGAAGATGATGTGTTGAAAGCTTTCTGAAAATGCTGAT  
CATTACTTTAAATGGAATTGAAATTCAGTTTATTATTTCCAAAAATATGATCTTACT  
GATCATAGGATAACATTTACATAACATTTAGAGATTTCTTCCCCTTCGAGGAGCCAA  
ACCCATAGGACCTCTGGACTCCCACAGATCCTGGCAGGGAGTTCCCACTCATAAAA  
GCACAGGTGCCCTCAGAGTCATTCAGGGATGAAGAAGCAACCCTCATTGGCCATGT  
CCTACGTTCCCATATAGTAAGGACTGGAGGAGACCAGTGCTCAATTCTGCAGTCTC  
AGACAGCTGTCAGAGGAGAGTCATGAATGTGCAGTGTCTAGCACATTACAAACGTT  
TGTTAATTGACTGATCATTGATGGTGTGACAGCCCTATAACTCAGCTATCCTATTGAG  
TCAGAAATTAACCTCAGTAATCAAAGTCATTAAGGAAGAAAAAAAAAACCTACAG  
TACCAGACAGATGGTGGGGAAATCAGACAGATGAAAGGAAAAATGGCTGTAGGTC  
ATTGAGTAAGACACTGGGCAGCAAAACCTGGGCCTTGTGCCTGGTTATACTCCACAT  
TATAGCTCCAGCAAGGTTTGGCAGGATTTCCACAGTCCTGGCTTATTCTAACCTTTCT  
TGGGAGCAGGAGCAGTGTGGTTCAGATAGACAGACACATAAGGAATCTGTCCAACCT  
GGCACCGTGTGAATTTGGGCTCTTGGTGTACATGGATAACTGGGAAAAAGAGGAGA  
GAGACATGTAGGACTGATCCTACCGTTTGTGAAGTCTTGGGCAAGAGTATGAATGA  
AAACCCACTTCTCTTCCCCTGCCTGGCTCCACTGCACACAGTAAAGAGCCTCAAGCA  
TAGGTGTGTGGACATTGCACCATGTATCCAAGCTCTGACCATGCCTCTTGAAACAGC  
TATTCCTCAGCCACCCTCTGACCATGGGAGGAATGACCCAGGAGAAATGACCACAT  
AGGTCTTGAAAATGGGCTCAGGGCTATTTACGAAGTCAATTCCGGGGTCCCAGGAG  
TATGGACTAAAATGTGAGTCAGGCATGCCAGATGGGTATGTTCTATTGACTTCAAGG  
ATTCCTCATGCTGTGGGAAGGAACCTCTCCAGAAGAGAGACAGAGCAGAACCCTCT  
AAATGTGGGGCACAAAGCAGGAGCCCCTCTTGGTGGATTCAAAGGGTCATACTGGA  
AGAGTGTAGGTTGAGTCTTATTCTCACATCACTCATATCACTTACACACTTCTTTTAT  
AGCCTTAGCAGCCATGCCACAAAGAGAACTCTTCATGCATATCTTTTGGTCCATAA  
GTCATAAATAGTTATCCTTGATCCCATGTCTTTTTTAGAGCCATGGACAGAGAGAAG  
CAAAAATATACCAAGTTCACACTGAGTTGTCTCCCTTCATATCTCTTAGCAGTCACT

GAAAGGTTATGAGACTCAGGCTGGGTTTCTATCCTCTGTCCCTGAAACGACAACGTT  
GACCTCGTGATCAACCCTAGAATCCAGAGCAAGATCTCAGACTGTCTCTCTACTAC  
CAGACAGCACACTTTGTTTTGGGGGCTGTGTGCTTGAAATATTAGCTATGGCAAAG  
GCTTTGAGTCTTATGACACCCCAAGTAACTTTTACTTTAGGAATTTGAAATACAGCC  
TTGCTGTAATGCTGTCTCCTTAACAAAGCAGTACCTTTGAAATATTTAACAACTTGA  
AAAGGAAACCGAGCTTGAATTTTCCTTTTCAGGTGCTCAGGAAATAATGTTTCACTTC  
TGTCTGAAATTCACCATCTCCTCAGACAAAGAAGGCTCTTATGGTAAAAGGAATGGC  
ATTTTCTCCACAATTTTCGAATAAAAGATAAAGAGAAAACAGCACTGCAGCCTTTTT  
GTTAGGATCTAACAATAAAGAAATAATACGGTTTTTGCCAGGGGAGAGCTCTGGTTTT  
AAGCTCAGAATACAAAATAGGCTGACAAAATTTTACAAAGGAATATTCTCAGCTA  
CCACTCTGAGGATGGTAGAAAGTGAAATTTCAAGAAAATTATATTATTTGATTATTT  
GATGATGATTAAGCTGATTGGCCAGTCCTATGTGAAATTCTAAAGTAGAAGAAATGT  
GATGTTGTCTTTTCTGCTCACCTCTCCCCTCATTCTACCCCAAATCTCTGCCTCTAC  
CCCAAACCCAGCCTGACCTTTGGGAAAGGAATGGGGGCTGTCACTTGCACCGTAGC  
TCCTCCTGCCTGCAGTACTCTCCCCCACAGTCCAGCCTCCCTCTGCTCAGCTAACTT  
TTCCTATAGCTCCTTCTGGCTACTTCTAAGGAACCTTCCATAATGCTGCCACCCTCT  
CAGTAACAGCCCCTCTACTATCCCTTGATTACATGCACTGTAATTGGTTAGTAATTG  
ATTTTATGTCCTCTGCCAAATTATACTCCATGAGAGCAAAAATCATGAGTATTATCTT  
TAATGTTTAAATCTCCACA ACTATCCCCATATAAGTCTAGAGAATAAATGAATGAG  
TGAATTAATGAATAGAACTCAAGCCATTATGTTGCCACTCCTAGGATATTTGGATT  
AACTTTAACTGAAGAGTAAAAAGCATTACCTGTCCTAAAGGAGACATAAAAATTAG  
TGGGAGAGTATTTGGAGAAAAAAAAGACACTGTAATACATTCTTTTGTGTTGCCTAC  
CCTGATGTAGTCAGGTGTCCCTGATATGGGGTGGGCTGAGGATTTGAAATAAAAATAC  
CTAATTTGACATTGTAAGTGGAGGAATCAGGATTTGAAACCAAATTGGTTTGACCTA  
AATCAAGCTATTATGATAAGGACTTGCAAGAAAAAAGGAATCCATAAAAACCATAT  
GAATAGCTACCAATTAGTAAGCATTATATGTGTCAATTACAAAGCCAAATGCAAAT  
CATGCTTTATTTATATTAGCCACCTTTTATAGATGAAGAAATTGAGACCTGAATATT  
AAAATTGCCTACTTTTACATAGTAAGTAAAGGAATCAGGGTTTGAACCCAAATTGGT  
TTCACCTAAGGTAGAAAACCATCCCAGCAAGTCTCCTATTA ACTGGAACCCTATTGT  
GGTGGCCTGAGATATAACAGTAGCTGTGGAAGCGCTGTAGAGTCTGGCCATCCTAT  
GTGCTCCTGATCTGGTCCCTCCTGCCACCTGCTTCTGCTCCCTGTGCCATCCACCCAT  
CTGGAAGTCTCCAGTGTCCATCTTCGGGGGAGACACTCACCAGAGTTTCCAGCTTC  
CAGCCAGTATGGAGTGCCCTGTCCACAGCAATCTCACCGAAATCACAGCTACATC  
TGTTAAAATTAGGCTACCAATGAGTGATAGATGAGGGGGAAAAATAATAATAGTGT  
ACTAAACAAAACAAATGTTTATTTTTCTCACACATAAAAATCTAGAGGTTGAAGTCC

AGGGCTGGTCCAGAGGCTCCAAGGATCTGGGATTTAGACTCCCTCTTTCTTGTTTTTC  
CACAGCATATGGCTTCCATTTCTGGGGCCACATTGGTCCAAAATGTATGCTGGGGCT  
CCAGCCATTGCATCCATATTTTCAGCCACAGGAAGGAGGAAGTGGGGAAGAAAGGAC  
AGGCCCTAATACCTGTATAGTTCAAGAAGACTATCCCGCCATACTTCCCAACCAC  
CCTTAGTTGAACAATGCTGTCTTAATTCAAGACACTCACATGTCTAGCCAAAAATCT  
GAATTCTGTTACAAACAAGGAGAATAGAGATGTGCGCCACCTCAATACCTCATCCAT  
AGCTACCTTTTCCTTTGTGCAGCTGTGGCCAAGTGAAAGCTGAAGGAGCTGTGGTAA  
CCCTTCTGAAGGGAGGCTGGGGCCTTTCACAAGAGGCTGCATGATTGACATTTATCC  
TGCATGGCCTGTGAAGTACAGAGAAATATTTTCTCTTGAAGCCACATCATAGCAGTG  
GCTGCTTTGTAGCCTGATTCCACCATTATGCCTTTAAAGTGCCTAGCAATTCAGCCTT  
CACATCATGCAAAGAGGAATATCTCCCAGTCTTTGTAAGATCAGCTTAATTCTAACC  
ACCTCCTTACCTCCCCTACTGCACTCCTACACGCACACACAAATCTTCTTCACTCAGAG  
CAGAACCATAACCCAAGCCCTACCACCTAGAGACTGAAGAATCAGGCTCATGATTA  
CAAATATGCAATAATTTTTTGTGTGGATAATGTCAATGGGGATGATGGTAAGAGAAT  
TCCTTGGTTTACACATTGACCCTCTTCCCTGTCCCTTACAATCAGGAAATATTTGTCC  
CAACACCTTGTTTCTTCTGTTGCAGGCTCCTGTGGCTGTCTTGTGCATGATATTGTTTG  
CCTCTGAAGTGAAAATCCATCACCTCTCAGAAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGG  
ACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAATATAACCACCTCATTCTGGGTCATTTTC  
TTTTGCTTTTTTGTTCATTTTCTGAATGGGCTCCTAATACGACTTGCTGGATTTTCAGTT  
CCCTTTTGCAAATCTAAAGACGCAGAAACAATAATGTAGCTGCAGATCTAATGTA  
CTGAAAGGCAAACCTTTCTATAATTTTACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTT  
TAGATGTGGTTAATTTTGCATATCCTTTTAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCC  
TTCGTGACAATGTTTACAAATTACGTAATAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAA  
GCAGAAGGAAGGCTTTGAAAAGTTGTTTTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGT  
AGTCAAAGGCAGTTGACTAGAATCGACAAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTG  
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAGATGTCTTCCCTATCAAAAAGATATCAAAGGCA  
CATGGAATATATTTTAATAAAAACAAATAATATCTCTAATATATCCACACATTTGTT  
GCCAGATTTTCAGAAAACCTGAGCTGCAATCGCTTTCCTAAAACAGTAGTGTATTAAT  
GAACATCTATAAAATGTATCAACACACATTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCT  
TAGGCCAGGCGTGGTGACTCACACCTGTAATTCCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTG  
GGAAGATCATTGAGTTCAGGAGTTCGAGTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACC  
CTGTCACTAACAAAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
CATAGTCTTATTAACCATGTCTGTTGGTCAAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAA  
GAAGAAAAAACCAAGCTTAGGGTATTTTTCCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATT  
CACGACAGTACTTTCAATGAACATAATTGTTAGGACCCTGAGGAATCATGAAAA

TGATCTCTGCTTAGTACATTTGATGCAAAATGACTTATTAGGGGCTGTTTTCTAGCT  
 ATAGTGTCTCGAGTACTAATATGCAATTATGAAAATTATATTAATCTGGGATTATG  
 ACGGTATCACTGTATCATCTTGGTCTTGTCTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGT  
 CAACTTTTTTTTTCCCCTGAATTACCCATCAAATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCA  
 CAGCTGAGCCTGGAAGTACCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCTCCAGAAAGC  
 ACCAAGGAAAAAGCAGAGAATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAG  
 GTGCTGAGTACTCAGCAGCCCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAA  
 AACTGTTTCCCTTTGGAAGTATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAAT  
 AACTTGCTCTGGTGTCAATTCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTTT  
 CCAGATGCTGGTTTTTCCCCTTAAATCAGGAAATACACCTGGACAATTTCTAGAAGA  
 CTACAATTCAGTCTAGCCACAAAGGGGATTTTTTTTTTTTGGTAACAGGCTAGAGCC  
 CGGTTCTGTAAGTCTTTAGCTGAAATGGTCCAGTACAAAAGCACTGGAAATGAGTG  
 GGCTAGGAGGACAAGGACCGTCTCCTGCGTGAGGAGTTGGTTGGAGGTCCCCAAGG  
 CCAGGTACCCCCTGCACTCTTATTGGATTCTCTCTGTCTTCTTGGAGTTTTGAAAAA  
 CTCCTTCGAACACCAGGCTTTTTTCTTTAGAAAACAAGTCTCCAATCGTTCTCTGTTC  
 CGTAGAAAGAGAAAGAAAACCTGGAGCAGCTGCTGAAAAATCTAATGAGGAACTA  
 AGAGGCAAACCCACCA

**[0123] Иллюстративная последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа A),  
 включая нетранслируемые области (SEQ ID NO: 6)**

ACAGAAGCCGTTTCTCATCATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGC  
 CGGAGTGTTTCAGTTTTGCATGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTT  
 GTGGATCAAAGCCACTGTCCCTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGG  
 GCAGGAGCTGGACAAGTTTATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGG  
 GTGTGAGGCAGTGTGGGTTGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATTTTTTCCAGATT  
 TGCTCAAAGCAATCCCAGTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTTCTCTGCCATCCT  
 TATTGTGTTAACCATGGTGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAAACC  
 TTTTGAAACTCTGCATGGTCCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTTCAGGCTCC  
 TGTGGCTGTCTTGTCAATGATATTGTTTGCCTCTGAAGTGAATAATCCATCACCTCTCAG  
 AAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGGACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAA  
 TATACCACCTCATTCTGGGTCATTTTCTTTTGTCTTTTTTGTTCATTTTCTGAATGGGCT  
 CCTAATACGACTTGCTGGATTTTCAGTTCCCTTTTGCAAAATCTAAAGACGCAGAAAC  
 AACTAATGTAGCTGCAGATCTAATGTACTGAAAGGCAAACCTTTCTATAATTTTACA  
 AGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTTAGATGTGGTTAATTTTGCATATCCTTTTAG  
 TCTGCATATATTAAGCATCAGGACCCTTCGTGACAATGTTTACAAATTACGTAATA  
 AGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAGCAGAAGGAAGGCTTTGAAAAGTTGTTTTA



TGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAATATACCACCTCATTCTGGCTGACTAAAGGCC  
 ACAGCTGAGCCTGGAAGTACCCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCTCCAGAAAG  
 CACCAAGGAAAAAGCAGAGAATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACA  
 GGTGCTGAGTACTCAGCAGCCCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAA  
 AACACTGTTTCCCTTTGGAAGTATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAA  
 TAACTTGCTCTGGTGTCAATTCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTT  
 TCCAGATGCTGGTTTTTCCCCTTAAATCAGGAAATACACCTGGACAATTTCTAGAAG  
 ACTACAATTCAGTCTAGCCACAAAGGGGATTTTTTTTTTTTTGGTAACAGGCTAGAGC  
 CCGGTTCTGTAAGTCTTTAGCTGAAATGGTCCAGTACAAAAGCACTGGAAATGAGTG  
 GGCTAGGAGGACAAGGACCGTCTCCTGCGTGAGGAGTTGGTTGGAGGTCCCCAAGG  
 CCAGGTACCCCCTGCACTCTTATTGGATTCTCTCTGTCTTCTTGGAGTTTTGAAAAA  
 CTCCTTCGAACACCAGGCTTTTTTCTTTAGAAAACAAGTCTCCAATCGTTCTCTGTTC  
 CGTAGAAAGAGAAAGAAAACCTGGAGCAGCTGCTGAAAAATCTAATGAGGAACTA  
 AGAGGCAAACCCACCA

**[0125] Иллюстративная последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа D),  
 включая нетранслируемые области (SEQ ID NO: 8)**

AGGAGATACTTGAAGGCAGTTTGAAAGACTTGTTTTACAGATTCTTAGTCCAAAGAT  
 TTCCAATTAGGGAGAAGAAGCAGCAGAAAAGGAGAAAAGCCAAGTATGAGTGATG  
 ATGAGGCCTTCATCTACTGACATTTAACCTGGCGAGAACCGTCGATGGTGAAGTTGC  
 CTTTTCAGCTGGGAGCTGTCCGTTACGCTTCCGTAATAAATGCAGTCAAAGAGGCAG  
 TCCCTTCCCATTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTTGAACCTCGCCCTCACAGAAGCCGTT  
 TCTCATCATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGCCGGAGTGTTCCAG  
 TTTTGCATGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTTGTGGATCAAAGC  
 CACTGTCCTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGGGCAGGAGCTGG  
 ACAAGTTTATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGGAGAGGGTGTGAGGCAG  
 TGTGGGTTGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATTTTTTCCAGATTTGCTCAAAGCA  
 ATCCCAGTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTCTGCCATCCTTATTGTGTAA  
 CCATGGTGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTTGGAAAACCTTTTGAAACTC  
 TGCATGGTCCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTAGTTGCCCTTTGGCTGCC  
 AGCTACCAGGCACCAGGCTCAAGGCTCCTGTGGCTGTCTTGTTCATGATATTGTTTGC  
 CTCTGAAGTGAAAATCCATCACCTCTCAGAAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGGA  
 CTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAAAAATATACCACCTCATTCTGGGTCATTTTCT  
 TTTGCTTTTTTGTTCATTTTCTGAATGGGCTCCTAATACGACTTGCTGGATTTAGTTC  
 CCTTTTGCAAAATCTAAAGACGCAGAAACAATAATGTAGCTGCAGATCTAATGTAC  
 TGAAAGGCAAACCTTTCTATAATTTTACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTT

AGATGTGGTTAATTTTGCATATCCTTTTAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCCT  
TCGTGACAATGTTTACAAATTACGTACTAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAG  
CAGAAGGAAGGCTTTGAAAAGTTGTTTTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGTA  
GTCAAAGGCAGTTGACTAGAATCGACAAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTGT  
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAGATGTCTTCCTATCAAAAAGATATCAAAGGCAC  
ATGGAATATATTTTAATAAAAACAATAATATCTCTAATATATCCACACATTTGTTG  
CCAGATTTTCAGAAAACCTGAGCTGCAATCGCTTTCCATAAACAGTAGTGTATTAATG  
AACATCTATAAAATGTATCAACACACATTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCTT  
AGGCCAGGCGTGGTGACTCACACCTGTAATTCCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTGG  
GAAGATCATTTGAGTTCAGGAGTTCGAGTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACCC  
TGTCACTAACAAAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATATAGGCTTTAAAAAAGC  
ATAGTCTTATTAACCATGTCTGTTGGTCAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAAG  
AAGAAAAACCAAGCTTAGGGTATTTTTCCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATTC  
ACGACAGTACTTTCAATGAACATAATTGTTAGGACCACTGAGGAATCATGAAAAT  
GATCTCTGCTTAGTACATTTGATGCAAAATGACTTATTAGGGGCTGTTTTTCTAGCTA  
TAGTGTCTCGAGTACTAATATGCAATTATGAAAATTATATTAATCTGGGATTATGA  
CGGTATCACTGTATCATCTTGGTCTTGTCTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGTC  
AACTTTTTTTTTCCCTGAATTACCCATCAAATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCAC  
AGCTGAGCCTGGAACCTGACCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCTCCAGAAAGCA  
CCAAGGAAAAAGCAGAGAATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAGG  
TGCTGAGTACTCAGCAGCCCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAAA  
CACTGTTTCCCTTTGGAACATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAATA  
ACTTGCTCTGGTGTCAATTCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTTTC  
CAGATGCT

**[0126] Иллюстративная последовательность кДНК CLRN1 человека (изоформа E),  
включая нетранслируемые области (SEQ ID NO: 9)**

ACAGAAGCCGTTTCTCATCATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGCATGGC  
CGGAGTGTTCAAGTTTTGCATGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACACCGTT  
GTGGATCAAAGCCACTGTCTCTGCAAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCCTCAGG  
GCAGGAGCTGGACAAGTTTATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTCCACGGAGAGG  
GTGTGAGGCAGTGTGGGTTGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATGCTATTTTCTTG  
ACCCCTTCATGGGACTCCCAACAGGGGTACCCCATTTACTCAGCCTGCCCTGCTCAA  
CCTCTTGCAGGAGGGAGCACACGAGTGAACGAGTGCAGGAACCAGCTGGCTGCTTT  
AGTGCTGTGAGGAGTAAACTCCATGCAGGCCCTGCAGCAGCAACCAGTTTTTCCAG  
ATTTGCTCAAAGCAATCCAGTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTTCTCTGCCAT

CCTTATTGTGTTAACCATGGTGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGGAAA  
ACCTTTTGAAACTCTGCATGGTCCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTTCAGGC  
TCCTGTGGCTGTCTTGTTCATGATATTGTTTGCCTCTGAAGTGAAAATCCATCACCTCT  
CAGAAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGGACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTGAA  
AAATATACCACCTCATTCTGGGTCATTTTCTTTTGCTTTTTTTGTTTCATTTTCTGAATGG  
GCTCCTAATACGACTTGCTGGATTTTCAGTTCCCTTTTGCAAATCTAAAGACGCAGA  
AACAACTAATGTAGCTGCAGATCTAATGTACTGAAAGGCAAACCTTTCTATAATTTT  
ACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTTAGATGTGGTTAATTTTGCATATCCTTT  
TAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCCTTCGTGACAATGTTTACAAATTACGTA  
CTAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAGCAGAAGGAAGGCTTTGAAAAGTTGTT  
TTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGTAGTCAAAGGCAGTTGACTAGAATCGAC  
AAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAGAT  
GTCTTCCTATCAAAAAGATATCAAAGGCACATGGAATATATTTTAATAAAAACAAAT  
AATATCTCTAATATATCCACACATTTGTTGCCAGATTTTCAGAAAACCTGAGCTGCAAT  
CGCTTTCCATAAACAGTAGTGTATTAATGAACATCTATAAAATGTATCAACACACA  
TTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCTTAGGCCAGGCGTGGTACTCACACCTGT  
AATTCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTGGGAAGATCATTTGAGTTCAGGAGTTCGA  
GTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACCCTGTCACTAACAAAATTAATAAAATAAAA  
TAAATATAAAATATAGGCTTTAAAAAAGCATAGTCTTATTAACCATGTCTGTTGGTC  
AAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAAGAAGAAAAAACCAAGCTTAGGGTATTTT  
TCCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATTCACGACAGTACTTTCAATGAACATAATT  
GTTAGGACCACTGAGGAATCATGAAAAATGATCTCTGCTTAGTACATTTGATGCAAA  
ATGACTTATTAGGGGCTGTTTTTCTAGCTATAGTGTCTCGAGTACTAATATGCAATTA  
TGAAAATTATATTAATCTGGGATTATGACGGTATCACTGTATCATCTTGGTCTTGTT  
CTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGTCAACTTTTTTTTTCCCTGAATTACCCATCA  
AATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCACAGCTGAGCCTGGAACCTGACCCTTCCTTCA  
TCCTCAACCTGCTGTCTCCAGAAAGCACCAAGGAAAAAGCAGAGAATGACAGCAA  
ACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAGGTGCTGAGTACTCAGCAGCCCTCATATAATA  
GGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAAACACTGTTTCCCTTTGGAACCTTTTACAAGG  
ATGAAACAACCGTATACCTGAGAAATAACTTGCTCTGGTGTCAATTTCGCTATTCGCC  
AGCAGACATCAGAACACACCGAGTTTCCAGATGCT

[0127] В настоящем раскрытии подразумевается, что определенные изменения в последовательности полинуклеотида не повлияют на его экспрессию или белок, кодируемый данным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит ген CLRN1, имеющий одну или более молчащих мутаций. В

некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, который содержит ген CLRN1, имеющий одну или более молчащих мутаций, например, ген CLRN1, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, но кодирующий ту же аминокислотную последовательность как функциональный ген CLRN1.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему ген CLRN1, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую одну или более мутаций (например, другую аминокислоту последовательность по сравнению с последовательностью, полученной из функционального гена CLRN1), причем одна или более мутаций представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему ген CLRN1, имеющий последовательность, отличную от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую одну или несколько мутаций (например, другую аминокислотную последовательность по сравнению с последовательностью, полученной из функционального гена CLRN1), где одна или несколько мутаций не находятся в пределах характерной части гена CLRN1 или кодируемого белка кларина 1.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением содержит ген CLRN1, который по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением содержит ген CLRN1, который идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. Как следует из уровня техники, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 можно оптимизировать (например, оптимизировать по кодонам) для достижения повышенной или оптимальной экспрессии у животного, например, у млекопитающего, например, у человека.

*Полипептиды, кодируемые геном CLRN1*

**[0128]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены полипептиды, кодируемые геном CLRN1 или его характерной частью. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 мыши. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 примата. В некоторых вариантах осуществления ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 человека.

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит белок кларин 1 или

его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления белок кларин 1 или его характерная часть представляет собой белок кларин 1 млекопитающего или его характерную часть, например, белок кларин 1 примата или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления белок кларин 1 или его характерная часть представляет собой белок кларин 1 человека или его характерную часть.

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления белок кларин 1 или его характерная часть, представленные в настоящем документе, содержат посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционные модификации могут включать, но не ограничиваться ими, гликозилирование (например, N-связанное гликозилирование, O-связанное гликозилирование), фосфорилирование, ацетилирование, амидирование, гидроксильное, метилирование, убиквитинирование, сульфатирование и/или их комбинацию.

**[0131]** Типовая последовательность белка кларина 1 человека представляет собой или включает последовательность SEQ ID NO: 10, 11, 12 или 13. Типовая последовательность белка кларина 1 человека с flag-меткой на C-конце представляет собой или включает последовательность SEQ ID NO: 14.

**[0132] Иллюстративная последовательность белка Clarin 1 человека (изоформа A) (SEQ ID NO: 10)**

MPSQKKIIFCMAGVFSFACALGVVTALGTPLWIKATVLCKTGALLVNASGQELDKFM  
GEMQYGLFHGEGVRQCGLGARPFRFSFFPDLLKAIPVSIHNVILFSAILIVLTMVGTAFF  
MYNAFGKPFETLHGPLGLYLLSFISGSCGCLVMILFASEVKIHHLSEKIANANYKEGTYVYK  
TQSEKYTTTSFWVIFCFVHFLNGLLIRLAGFQFPFAKSKDAETTNVAADLMY

**[0133] Иллюстративная последовательность белка 1 кларина человека (изоформа C) (SEQ ID NO: 11)**

MQALQQQPVPDLLKAIPVSIHNVILFSAILIVLTMVGTAFFMYNAFGKPFETLHGPLG  
LYLLSFISGSCGCLVMILFASEVKIHHLSEKIANANYKEGTYVYKTQSEKYTTTSFWLTKGHS

**[0134] Иллюстративная последовательность белка 1 кларина человека (изоформа D) (SEQ ID NO: 12)**

MPSQKKIIFCMAGVFSFACALGVVTALGTPLWIKATVLCKTGALLVNASGQELDKFM  
GEMQYGLFHGEGVRQCGLGARPFRFSFFPDLLKAIPVSIHNVILFSAILIVLTMVGTAFF  
MYNAFGKPFETLHGPLGLYLLSFISVALWLPATRHQAQGSCGCLVMILFASEVKIHHLSE  
KIANANYKEGTYVYKTQSEKYTTTSFWVIFCFVHFLNGLLIRLAGFQFPFAKSKDAETTNV  
AADLMY

**[0135] Иллюстративная последовательность белка 1 кларина человека (изоформа E) (SEQ ID NO: 13)**

MPSQQKKIIFCMAGVFSFACALGVVTALGTPLWIKATVLCCKTGALLVNASGQELDKFM  
GEMQYGLFHGEGVRQCGLGARPF RFSCYFLDPFMGLPTGVPHLLSLPCSTSCRREHTSE  
RVQEPAGCFSAVRSKLGAGPAAATSFSRFAQSNPSEHPRQCHSLLCHPYCVNHGGDSL  
LVQCFWKTF

**[0136] Иллюстративная последовательность белка кларина 1 человека (Изоформа a) с flag-меткой на C-конце (SEQ ID NO:) 14)**

MPSQQKKIIFCMAGVFSFACALGVVTALGTPLWIKATVLCCKTGALLVNASGQELDKFM  
GEMQYGLFHGEGVRQCGLGARPF RFSFFPDLLKAIPVSIHVNVILFSAILIVLTMVGTAF  
FMYNAFGKPFETLHGPLGLYLLSFISGSCGLVMILFASEVKIHHLSEKIAN YKEGTYVYK  
TQSEKYTTSFVWIFFCFFVHFLNGLLIRLAGFQFPFAKSKDAETTNVAADLMYGSRADY  
KDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

**[0137]** В настоящем раскрытии подразумевается, что определенные мутации в аминокислотной последовательности полипептида, описанного в данном документе (например, включая кларин 1 или его характерную часть), не будут влиять на экспрессию, укладку или активность полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид (например, включая кларин 1 или его характерную часть) включает одну или более мутаций, причем одна или более мутаций представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит кларин 1 или его характерную часть, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит кларин 1 или его характерную часть, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит кларин 1 или его характерную часть, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит белок кларин 1 или его характерную часть, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 14.

**Конструкции**

**[0138]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предусмотрено, что некоторые

полинуклеотиды, описанные в данном документе, представляют собой полинуклеотидные конструкции. Полинуклеотидные конструкции в соответствии с настоящим изобретением включают все известные в данной области техники, включая космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусные конструкции (например, лентивирусные, ретровирусные, аденовирусные и аденоассоциированные вирусные конструкции), которые включают полинуклеотид, содержащий ген CLRN1 или его характерную часть. Специалисты в данной области смогут выбрать подходящие конструкции, а также клетки для получения любого из описанных в данном документе полинуклеотидов. В некоторых вариантах конструкция представляет собой плазмиду (т.е. молекулу кольцевой ДНК, которая может автономно реплицироваться внутри клетки). В некоторых вариантах осуществления конструкция может представлять собой космиду (например, серию pWE или sCos).

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция представляет собой лентивирусную, ретровирусную, аденовирусную или аденоассоциированную вирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой аденоассоциированную вирусную (AAV) конструкцию (см., например, Asokan et al., *Mol. Ther.* 20: 699-7080, 2012, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция представляет собой аденовирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция также может быть основана на альфавирусе или получена из него. Альфавирусы включают вирус Синдбис (и VEEV), вирус Аура, вирус Бабанки, вирус леса Барма, вирус Бебару, вирус Кабассу, вирус Чикунгунья, вирус восточного лошадиного энцефалита, вирус Эверглейдс, вирус Форт-Морган, вирус Гета, вирус Хайлендс J, вирус Кызылагач, вирус Майаро, вирус Ме Три, вирус Мидделбурга, вирус Mosso das Pedras, вирус Мукамбо, вирус Ндумо, вирус Вирус О'ньонг-ньонг, вирус Пиксуна, вирус Рио-Негро, вирус Росс-Ривер, вирус болезни поджелудочной железы лосося, вирус леса Семлики, вирус южного морского слона, вирус Тонате, вирус Трокара, вирус Уна, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей и вирус Ватароа. Как правило, геном таких вирусов кодирует неструктурные (например, репликон) и структурные белки (например, капсид и оболочечный белок), которые могут транслироваться в цитоплазме клетки-хозяина. Вирус Росс-Ривер, вирус Синдбис, вирус леса Семлики (SFV) и вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) были использованы для разработки вирусных конструкций для доставки кодирующей последовательности. Псевдотипированные вирусы могут быть образованы путем

объединения альфавирусных оболочечных гликопротеинов и ретровирусных капсидов. Примеры альфавирусных конструкций можно найти в публикациях США № 20 150 050 243, 20 090 305 344 и 20 060 177 819; конструкции и способы их изготовления полностью включены в данный документ посредством ссылки на каждую из публикаций.

**[0140]** Представленные в данном документе конструкции могут быть разных размеров. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду и может иметь общую длину до около 1 т.п.н., до около 2 т.п.н., до около 3 т.п.н., до около 4 т.п.н., до около 5 т.п.н., до около 6 т.п.н., до около 7 т.п.н., до около 8 т.п.н., до около 9 т.п.н., до около 10 т.п.н., до около 11 т.п.н., до около 12 т.п.н., до около 13 т.п.н., до около 14 т.п.н. или до около 15 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду и может иметь общую длину в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до примерно 4 т.п.н., примерно от 1 т.п.н. около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 11 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 12 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 13 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 14 т.п.н. или от около 1 т.п.н. до около 15 т.п.н.

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусную конструкцию и может иметь общее количество нуклеотидов до 10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около

7 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 7 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 8 т.п.н. до около 10 т.п.н. или от около 9 т.п.н. до около 10 т.п.н.

**[0142]** В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой лентивирусную конструкцию и может иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.п.н. В некоторых примерах лентивирусная конструкция может иметь общее количество нуклеотидов от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой аденовирусную конструкцию и может иметь общее количество нуклеотидов до 8 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления аденовирусная конструкция может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

**[0144]** Любая из описанных в данном документе конструкций может дополнительно включать контрольную последовательность, например, контрольную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора,

последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли (А)), консенсусной последовательности Козак и/или дополнительных нетранслируемых областей, которые могут содержать пре- или посттранскрипционные регуляторные и/или контрольные элементы. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифичный промотор. Неограничивающие примеры контрольных последовательностей описаны в данном документе.

### **Компоненты иллюстративной конструкции**

#### *Последовательности инвертированных терминальных повторов (ITR)*

**[0145]** Последовательности конструкции, полученные из AAV, обычно содержат cis-действующие 5' и 3' ITR (см., например, В. J. Carter, in “Handbook of Parvoviruses”, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Как правило, ITR способны образовывать шпильку. Способность образовывать шпильку может способствовать способности ITR к самовоспроизведению, позволяя синтезировать вторую цепь ДНК независимо от праймазы. ITR также могут способствовать эффективному инкапсулированию конструкции AAV в частице AAV.

**[0146]** Частица гAAV (например, частица AAV2/Anc80) по настоящему изобретению может содержать конструкцию гAAV, содержащую кодирующую последовательность (например, ген CLRN1) и ассоциированные элементы, фланкированные 5' и 3' последовательностями ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой или содержит около 145 нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используется вся или практически вся последовательность, кодирующая ITR. Последовательность ITR AAV может быть получена из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR AAV2.

**[0147]** Примером молекулы конструкции, используемой в настоящем изобретении, является «cis-действующая» конструкция, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы фланкированы 5' или «левой» и 3' или «правой» последовательностями ITR AAV. Обозначения 5' и левая относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции, читаемой слева направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 5' или левая ITR представляет собой ITR, наиболее близкую 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, читаемой слева направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 3' или правая ITR представляет собой ITR, наиболее близкую к последовательности полиаденилирования (в отличие от последовательности промотора) для данной конструкции, когда конструкция изображена в смысловой ориентации линейно. ITR, предложенные в данном документе, изображены в порядке от 5' до 3' в соответствии со смысловой цепью. Соответственно, специалисту в данной области техники будет понятно, что 5' или «левая» ориентация ITR также может быть изображена как 3' или «правая» ITR при преобразовании из смыслового в антисмысловое направление. Кроме того, специалист в данной области техники вполне может преобразовать заданную смысловую последовательность ITR (например 5'/левую ITR AAV) в антисмысловую последовательность (например, 3'/правую последовательность ITR). Специалисту в данной области техники будет понятно, как модифицировать данную последовательность ITR для использования либо в качестве 5'/левой, либо 3'/правой ITR, или ее антисмысловой версии.

**[0148]** Например, ITR (например 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15, 17, 20 или 21. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16, 18, 20 или 22. В некоторых вариантах осуществления ITR включает одну или более модификаций, например усечения, делеции, замены или вставки, как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит менее 145 нуклеотидов, например, 127, 130, 134 или 141 нуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR 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 вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах

осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22.

**[0149]** Неограничивающим примером 5'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 15, 17, 20 или 21. Неограничивающим примером 3'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 16, 18, 20 или 22. В некоторых вариантах осуществления конструкции rAAV по настоящему изобретению содержат 5' ITR AAV и/или 3' ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления 5' AAV ITR последовательность может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления 5' AAV ITR последовательность может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления 3' последовательность AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления 3' последовательность AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления 3' последовательность AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-ITR AAV (например, SEQ ID NO: 15, 17 или 21, или 16, 18, 20 или 22) фланкируют часть кодирующей последовательности, например, все или часть гена CLRN1 (например, SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4). Способность изменять эти последовательности ITR находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см., например, тексты, такие 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 данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-ITR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична 5'-ITR, представленной SEQ ID NO: 15, 17, 20 или 21. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-ITR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична 3'-ITR, представленной SEQ ID NO: 16, 18, 20 или 22.

**[0150] Иллюстративная 5'-AAV ITR (SEQ ID NO: 15)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC  
GGGCGTCGGGCGACSTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA  
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

**[0151] Иллюстративная 3'-AAV ITR (SEQ ID NO: 16)**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG  
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG

AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

**[0152] Иллюстративная 5'-AAV ITR (SEQ ID NO: 17)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTCCGCC  
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG  
GTTCCCT

**[0153] Иллюстративная 3'-AAV ITR (SEQ ID NO: 18)**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG  
AGGCCGGGCGACCAAAGGTTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG  
AGCGAGCGAGCGCGCAG

**[0154] Иллюстративная 5'-AAV ITR (SEQ ID NO: 20)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGAC  
CTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT  
CCATCACTAGGGGTTCCCT

**[0155] Иллюстративная 5'-AAV ITR (SEQ ID NO: 21)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC  
GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA  
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT

**[0156] Иллюстративная 3'-AAV ITR (SEQ ID NO: 22)**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG  
AGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTG  
AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

**Промоторы**

**[0157]** В некоторых вариантах осуществления конструкция (например, конструкция гAAV) содержит промотор. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой ферментами/белками, которая может стимулировать и/или инициировать транскрипцию функционально связанного гена (например, гена CLRN1). Например, промотор обычно относится, например, к нуклеотидной последовательности, с которой связывается РНК-полимераза и/или любой ассоциированный фактор и с которой он может инициировать транскрипцию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция (например, конструкция гAAV) содержит промотор, функционально связанный с одним из неограничивающих иллюстративных промоторов, описанных в данном документе.

**[0158]** В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, промотор клеток млекопитающих,

вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифичный промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, такой как промотор РНК-полимеразы II млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы III, включая, но не ограничиваясь этим, промотор HI, промотор U6 человека, промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Как правило, промотор является промотором, способным стимулировать транскрипцию в клетке внутреннего уха или клетке глаза. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для улитки, или промотор, ориентированный на улитку. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток, или промотор, специфичный для поддерживающих клеток.

**[0159]** В данной области техники известно множество промоторов, которые можно использовать в данном документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в данном документе, включают промоторы от: EFl $\alpha$  человека, цитомегаловируса человека (CMV) (патент США № 5 168 062, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), убиквитина C человека (UBC), фосфоглицерат киназы I мыши, полиомы аденовируса, вируса обезьяны 40 (SV40),  $\beta$ -глобина,  $\beta$ -актина,  $\alpha$ -фетопротеина,  $\gamma$ -глобина,  $\beta$ -интерферона,  $\gamma$ -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 T-клеточного лейкоза человека HTLV), ITR AAV, интерлейкина-2, коллагеназы, полученного из тромбоцитов фактора роста, аденовируса 5 E2, стромелизина, гена MX мыши, белков, регулируемых глюкозой (GRP78 и GRP94),  $\alpha$ -2-макроглобулина, виментина, гена ГКГС класса I, H-2k b, HSP70, пролиферина, фактора некроза опухоли, гена  $\alpha$  тиреотропного гормона, легкой цепи иммуноглобулина, T-клеточного рецептора, DQa и DQ HLA, рецептора интерлейкина-2, ГКГС класса II, HLA-DRa ГКГС класса II, мышечной креатинкиназы, преальбумина (транстиретина), эластазы I, гена альбумина, c-fos, c-HA-ras, молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), гистона H2B (TH2B), гормона роста крысы, сывороточного амилоида человека (SAA), тропонина I (TN I), мышечной дистрофии Дюшенна, вируса иммунодефицита человека и вируса лейкоза гиббонов (GALV). Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники, см., например, Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007, каждая из которых включена в данный документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет

собой немедленно-ранний промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или включает SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 15. В определенных вариантах осуществления промотор содержит конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA, представленную в качестве примера в SEQ ID NO: 16. В определенных вариантах осуществления промотор содержит конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA, представленную в качестве примера в SEQ ID NO: 17. В определенных вариантах осуществления промотор включает промотор CAG или конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA/SV-40, представленные в качестве примера в SEQ ID NO: 43. В определенных вариантах осуществления промотор включает промотор CAG или конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA/SV-40, представленные в качестве примера в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательностям промотора, представленным SEQ ID NO: 14 или 15. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 16, 17, 43 или 44.

**[0160]** Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок (например, белок кларин 1), вызывает транскрипцию РНК из нуклеиновой кислоты в клетке при большинстве или во всех физиологических условиях.

**[0161]** Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (см., например, Boshart et al, *Cell* 41:521-530, 1985, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1-альфа (Invitrogen).

**[0162]** Индуцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Дополнительные примеры

индуцибельных промоторов известны в данной области техники.

**[0163]** Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно доставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор металлотионеина овцы (MT), промотор индуцируемого дексаметазоном (Dex) вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088, которая включена в данный документ полностью посредством ссылки); экдизоновый промотор насекомых (см., например, No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 93:3346-3351, 1996, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки), систему, индуцируемую тетрациклином (см., например, Gossen et al, Science 268:1766-1769, 1995, и Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518, 1998, каждый из которых полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки), RU486-индуцируемую систему (см., например, Wang et al, Nat. Biotech. 15:239-243, 1997; and Wang et al, Gene Ther. 4:432-441, 1997, каждый из которых полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки), и рапамицин-индуцируемую систему (см., например, Magari et al. J Clin. Invest. 100:2865-2872, 1997, который полностью включен в данный документ в качестве ссылки).

**[0164]** Термин «тканеспецифичный» промотор относится к промотору, который активен только в определенных типах клеток и/или тканях (например, транскрипция определенного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регуляторные и/или контрольные белки транскрипции, которые связываются с тканеспецифичным промотором).

**[0165]** В некоторых вариантах осуществления регуляторные и/или контрольные последовательности придают возможность тканеспецифичной экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные и/или контрольные последовательности связывают тканеспецифичные транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом.

**[0166]** В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток улитки. Неограничивающие примеры специфичных для волосковых клеток улитки промоторов включают, без ограничения, промотор АТОН1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор  $\alpha$ 9ACHR и промотор  $\alpha$ 10ACHR. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфичный для волосковых клеток улитки промотор, такой как промотор PRESTIN или промотор ONCOMOD. (См., например, Zheng et al., Nature 405:149-155, 2000; Tian et al. Dev. Dyn. 231: 199-203, 2004; и Ryan et al., Adv. Otorhinolaryngol. 66:

99-115, 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.)

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для клеток уха промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для клеток внутреннего уха промотор. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для несенсорных клеток внутреннего уха, включают, но не ограничиваются ими: GJB2, GJB6, SLC26A4,TECTA, DFNA5, COCH, NDP, SYN1, GFAP, PLP, TAK1 или SOX21. В некоторых вариантах осуществления кохлеарный промотор, специфичный для несенсорных клеток, может представлять собой промотор, специфичный для поддерживающих клеток внутреннего уха. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для поддерживающих клеток внутреннего уха, включают, но не ограничиваются ими: SOX2, FGFR3, PROX1, GLAST1, LGR5, HES1, HES5, NOTCH1, JAG1, CDKN1A, CDKN1B, SOX10, P75, CD44, HEY2, LFNG или S100b.

**[0168]** В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для клеток глаза промотор. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для клеток глаза, включают, но не ограничиваются ими: RPE65, RLBP1, VMD2, IRBP, GNAT2, PR1.7, PR2.1, HB569, CAR, GRK1, RK, В-PDE, GRM6, Nefh, Tuh1, SYN, GFAP или другие промоторы опсина или родопсина. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для клеток глаза, и примерное содержание, описывающее такие промоторы, следующие:

<b>Промотор в генной терапии сетчатки</b>			
RPE			
Пигментный эпителий сетчатки 65	RPE		Bainbridge et al., NEJM 2008, Bainbridge et al., NEJM 2015, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте
Ретинальдегид-связывающий белок 1	RLBP1		Choi et al., Mol Ther Methods Clin Dev 2015, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте

Вителлиформная макулярная дистрофия	VMD2	Esumi et al, JBC 2004, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Фоторецепторы		
Межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок	IRBP	Dyka et al., Adv Exp Med Biol 2014, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Трансдуцин альфа-субъединица	GNAT2	Dyka et al., Adv Exp Med Biol 2014, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Красный/Зеленый опсин	PR1.7, PR2.1	Alexander et al. Nat Med 2007, Komaromy et al., Hum Mol Genet 2010, Ye et al., Hum Gene Ther 2016, каждый из которых настоящим включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте
S-опсин	HB569	Glushakova et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2006, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Конусный аррестин	CAR	Dyka et al., Adv Exp Med Biol 2014, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Киназа G-связанного рецептора Промотор родопсинкиназы	GRK1 RK	Beltran et al., Gene Ther 2010, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте Khani et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2007,

		который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
$\beta$ -субъединица фосфодиэстеразы GMP	B-PDE	Ogueta et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Биполярные клетки		
Глутаматный рецептор 6	GRM6	Cronin et al., EMBO Mol Med 2014, van Wyk et al., PLoS Biol 2015, Hulliger et al., Mol Ther: Methods Clin Dev 2020, каждый из которых настоящим включен в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте
Ганглиозные клетки		
Нейрофиламент Тяжелый	Nefh	Hanlon et al., Front Neurosci 2017, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Поверхностный антиген Thy1	Tyh1	Alic et al., Neurosci Lett 2016, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
Синапсин	SYN	Gaub et al., PNAS 2014, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте
клетки Мюллера		
Глиальный фибриллярный кислый белок	GFAP	Kuzmanivic et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 2003, который настоящим включен в

		<p>настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте</p>
--	--	--

**[0169]** В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции AAV содержат последовательность промотора, выбранную из промотора CAG, CBA, CMV или CB7. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в данном документе, первая или единственная конструкция AAV дополнительно включает по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из промоторов, специфичных для улитки и/или внутреннего уха.

**[0170]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CBA, как указано в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 23.

**[0171] Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 23)**

GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCC  
CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG  
GGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG  
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA  
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

**[0172] Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 24)**

GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCC  
CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG  
GGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGC  
GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATG  
GCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

**[0173]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер/ промотор CMV/CBA, как указано в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 25.

**[0174] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 25)**

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA  
GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC

CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC  
 CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT  
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG  
 TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT  
 TTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG  
 GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG  
 CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGG  
 CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

**[0175] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 26)**

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA  
 GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC  
 CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC  
 CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT  
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG  
 TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT  
 TTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC  
 GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA  
 GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG  
 GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

**[0176] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 27)**

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA  
 GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC  
 CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC  
 CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT  
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG  
 TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT  
 TTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG  
 GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG

CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGCGG  
 CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC  
 GCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC  
 GTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG  
 CTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTC  
 CGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT  
 GCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGC  
 GCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCG  
 GTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGT  
 GCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCT  
 GCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC  
 GGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTG  
 CCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGC  
 GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA  
 TGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG  
 AAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG  
 CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGT  
 CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG  
 GACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT  
 GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG

**[0177] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 28)**

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA  
 GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC  
 CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC  
 CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACT  
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT  
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACG  
 TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT  
 TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC  
 GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA  
 GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCG  
 GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGC  
 CCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT  
 TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCT

TGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC  
 GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTG  
 CGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG  
 CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG  
 TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG  
 CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCTG  
 CACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG  
 GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGC  
 CGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCCG  
 CCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTAT  
 GGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG  
 AAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG  
 CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCGTC  
 CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG  
 GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT  
 GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTCTTTTCTTACAG

**[0178]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную конструкцию энхансер-промотор АТОН1 человека, как указано в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 29.

**[0179] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор АТОН1 человека (SEQ ID NO: 29)**

СТАТGGAGTTTGCATAACAAACGTTTGGCAGCTCGCTCTCTTACACTCCATTAACAA  
 GCTGTAACATATAGCTGCAGGTTGCTATAATCTCATTAATATTTTGGAAACTTGAAT  
 ATTGAGTATTTCTGAGTGCTCATTCCCATATGCCAGCCACTTCTGCCATGCTGACTG  
 GTTCCTTTCTCTCATTATTAGCAATTAGCTTCTTACCTTCCAAAGTCAGATCCAAGG  
 TATCCAAGATACTAGCAAAGGAATCAACTATGTGTGCAAGTTAAGCATGCTTAATAT  
 CACCCAAACAAACAAAGAGGCAGCATTTCTTAAAGTAATGAAGATAGATAAATCGG  
 GTTAGTCCTTTGCACACTGCTGGTGCTTTCTAGAGTTTTATATATTTTAAGCAGCTT  
 GCTTTATATTCTGTCTTTGCCTCCCACCCACCAGCACTTTTATTTGTGGAGGGTTTT  
 GGCTCGCCACACTTTGGGAAACTTATTTGATTTACGGAGAGCTGAAGGAAGATCAT  
 TTTTGGCAACAGACAAGTTTAAACACGATTTCTATGGGACATTGCTAACTGGGGCCC  
 СТАAGGAGAAAGGGGAAACTGAGCGGAGAATGGGTAAATCCTTGGAAGCAGGGG  
 AGAGGCAGGGGAGGAGAGAAGTCGGAGGAGTATAAAGAAAAGGACAGGAACCAA

GAAGCGTGGGGGTGGTTTGCCGTAATGTGAGTGTTCCTTAATTAGAGAACGGTTGAC  
AATAGAGGGTCTGGCAGAGGCTCCTGGCCGCGGTGCGGAGCGTCTGGAGCGGAGCA  
CGCGCTGTCAGCTGGTGAGCGCACTCTCCTTTCAGGCAGCTCCCCGGGGAGCTGTGC  
GGCCACATTTAACACCATCATCACCCCTCCCCGGCCTCCTCAACCTCGGCCTCCTCCT  
CGTCGACAGCCTTCCTTGGCCCCACCAGCAGAGCTCACAGTAGCGAGCGTCTCTCG  
CCGTCTCCCGCACTCGGCCGGGGCCTCTCTCCTCCCCAGCTGCGCAGCGGGAGCCG  
CCACTGCCCACTGCACCTCCCAGCAACCAGCCCAGCACGCAAAGAAGCTGCGCAAA  
GTAAAGCCAAGCAATGCCAAGGGGAGGGGAAGCTGGAGGCGGGCTTTGAGTGGCT  
TCTGGGCGCCTGGCGGGTCCAGAATCGCCAGAGCCGCCCGCGGTCTGTGCACATCT  
GACCCGAGTCAGCTTGGGCACCAGCCGAGAGCCGGCTCCGCACCGCTCCCGCACCC  
CAGCCGCCGGGGTGGTGACACACACCGGAGTCGAATTACAGCCCTGCAATTAACAT  
ATGAATCTGACGAATTTAAAAGAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAACCTGAGCAGGCTTG  
GGAGTCCTCTGCACACAAGAACTTTTCTCGGGGTGTAAAAACTCTTTGATTGGCTGC  
TCGCACGCGCCTGCCCGCGCCCTCCATTGGCTGAGAAGACACGCGACCGGCGCGAG  
GAGGGGGTTGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTGAGTGGCGCGTGCCGCTTTTTAAAG  
GGGCGCAGCGCCTTCAGCAACCGGAGAAGCATAGTTGCACGCGACCTGGTGTGTGA  
TCTCCGAGTGGGTGGGGGAGGGTTCGAGGAGGGAAAAAAAAATAAGACGTTGCAGA  
AGAGACCCGGAAAGGGCCTTTTTTTTTGGTTGAGCTGGTGTCCCAGTGCTGCCTCCGA  
TCCTGAGCCTCCGAGCCTTTCAGTGCAA

**[0180]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную конструкцию немедленный промотор SLC26A4 человека, как указано в SEQ ID NO: 30 или 31. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную конструкцию энхансер-промотор SLC26A4 человека, как указано в SEQ ID NO: 32, 33 или 34. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности промотора или конструкции энхансер-промотор, представленным SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33 или 34. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор SLC26A4 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 32, 33 или 34.

**[0181] Иллюстративный немедленный промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 30)**  
CTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGGTAGTCCGCGGGGCATTCCGG  
GCGG

**[0182] Иллюстративный немедленный промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 31)**

CTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGGAGTCCCACAGGGCCTGGCCCCGCCCTGA  
CCT

**[0183] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ  
ID NO: 32)**

TAAAGAGTTGTGAGTTGTGTAGGTGAGTTGCCATGGAGCTACAAATATGAGTTGATA  
TTCTGAAATCCTAGACAGCCATCTCCAAGGTTAAGAAAAATCCTTATGCACTCACTT  
GCAAAGATATCCACAGCATGCTCTTAATGGAGAAAAACAAAGCCTTAGATCAAATA  
TGTAAGTAATTTTTAGTTTTTTGAAAAGGTATGTTTGGGCTATAGATAAATCTGTTC  
AAAAACATGAGAGAAGATAATAATGGTTGAAAGGAGACACAGTGCTTGCCCTCAA  
GAAGTTTTTGTCTAGTGAGGGAGAGAGA ACTTGTATGTAAATAAAATTGTGTTACTA  
AGGTAGATAGTGAGAAGTAACTTAAGAGAGGATCAGATAAGGTATTAAGAGAATAC  
AGAAAAGGGTCTGGATTAATTCTGAACAGCATCAAAGAATGTTCTTGCAAGAGATA  
GTGTTTTACCCAGATCTTGAAGGTATGGATGAGGGTATACAGAGTGAGTATATTCAG  
ATTCTACTTTAAAACAAATACTTTCCTCTGTTGTAGTGGAGTTGAGCTATACATCCAA  
CAATAATGAAAAAATACACGCATATATACATATATGGAGAGAGATACATATTTTAG  
TACATGTAGCAATTGATTAATAAATGTACAGTTTAAGTCGCATGCAAAACCTTGGAG  
TGATAGCAAACCTTCATTGTAGGATGTTTAGCAGCATCTCTGGTCTCTACTCACTAGA  
TCCCAATAGCATCTCCCTAGGTGTGACAACCAAAAATGTCTCCAGGCATTGACCTCT  
GGAGGCAAAAAAGCCCTTTATTAAGAACCAGTGGTATACATAAGTAAAACATACA  
CAAGAGATTCCTCCCCTCTTCTCTGTATGTGAATAAAAATTGCAAAGTTCATGACCT  
GGATTTTCCTTTTAGGTTTCTTCTTTAGTGGTTCTTAACTTCATTGGGTGAAGTAAGC  
CTTTGAAGATCTGTTGAAAGCTGTTGACTCATTCACTTCTCAGGAAAACGCACATGC  
TGACTACCATTCAGAGAATTTGCATCAGGGTTCTCTGGGGAGGAGTTCTGAGTTCT  
GTTTCCAGGAGCTCGTAGAATTGTCATGGTCTGCATATGCAAGGCAGGTGGATTACG  
GAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGAAC  
ACTAACAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCTTCCTTCTGCCTTTCATCT  
TAACCATGCATTAGTTTTAACAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACACTGATGA  
GGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCCA  
GTTTATTCTTCCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTAG  
TGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAAACACACA  
CACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTGTAT  
CCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTCAAGGACTTATTAATA  
TAGAAACCTGGCCATTGTTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTGG  
CAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTTTCCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGG  
AGTCCCACAGGGCCTGGCCCCGCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGGG

ATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTCC  
 CGGTTCCGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCTGATAGGATC  
 GGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCCTTCGACCAAGGTGTCTGTTGC  
 TCCGTAATAAAACGTCCCCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGG  
 TAGTCCGCGGGGC

**[0184] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 33)**

GGCTGCTCGGAAAACAGGACGAGGGGAGAGACTTGCTCAATAAGCTGAAAGTTCTG  
 CCCCCGAGAGGGCTGCGACAGCTGCTGGAATGTGCCTGCAGCGTCCGCCTCTTGGG  
 GACCCGCGGAGCGCGCCCTGACGGTTCCACGCCTGGCCCAGGGGTCTGCACCTCTCC  
 TCCAGTGCGCACCTGGAGCTGCGTCCCAGGGTCAGGTGCGGGGAGGGAGGGAATCTC  
 AGTGTCCCCTTCCAGCCTTGCAAGCGCCTTTGGCCCCTGCCCCAGCCCCTCGGTTTGG  
 GGGAGATTTAGAACGCGGACAGCGCCCTGGCTGCGGGCCATAGGGGACTGGGTGG  
 AACTCGGGAAGCCCCAGAGCAGGGGCTTACTCGCTTCAAGTTTGGGGAACCCCGG  
 GCAGCGGGTGCAGGCCACGAGACCCGAAGGTTCTCAGGTGCCCCCTGCAGGCTGG  
 CCGTGCGCGCCGTGGGGCGCTTGTGCGGAGCGCCGAGGGCTGCAGGACGCGGACCA  
 GACTCGCGGTGCAGGGGGGCCTGGCTGCAGCTAACAGGTGATCCCGTTCTTTCTGTT  
 CCTCGCTCTTCCCCTCCGATCGTCCTCGCTTACCGCGTGTCTCCCTCCTCGCTGTCCT  
 CTGGCTCGCAGGTCATGGCAGCGCCAGGCGGCAGGTGCGAGCCGCCGCAGCTCCCC  
 GAGTACAGCTGCAGCTACATGGTGTGCGGGCCGGTCTACAGCGAGCTCGCTTCCAG  
 CAACAGCACGAGCGGCGCCTGCAGGAGCGCAAGACGCTGCGGGAGAGCCTGGCCA  
 AGTGCTGCAGGTAGCGGCCGCGCGGGCCTGCGTAGAGAGAAGCGGAGCGGGGCGT  
 CCACGCCTTGGGGAGGGAAGGGCGTCCCCAGCGGGCGAGAGTGGGGTGCGGGCGG  
 CGGAGCCCCTGGGCGCCAGCTGCTTCTCCAGAGGCCCGACTTTCGGTCTCCGGTCC  
 TCCACGCCGCCCTTCTGGTGGGAGGGTGGCTCCATCAGTCTCGGGCCCGAAATGAAC  
 TTACCTGGGAAACTCGCCTTTGGGGAGAGTGGGTCTAGGAGCCCCGTCTCTCTTTT  
 TCCTCTCTGAAGGAAACTTGGAGTGCCTCTTGGGGTACAGTGGGTCCCTGTTGCCTT  
 CTTGGGAGCTTGTTTAAATGAAATGAATAGGGAAACCCAGCTCTTGACCAGGAGGA  
 GTCCTTGAAACACTCAAGCTAAGTAGGCGGGCTACCATTCAGTTAGAGACCAGGAT  
 GCAAGCTAGAACCAGGGGAGCGCGGGGTGTGCCAAGTACTTCATCAGCAGGCTGT  
 GGGACCCCTGGGGAAAGCCACCCTCAGTCTCTAAACCCAAACATGCCGTAACCTAGA  
 TGTCACAAACATAAAGAAATTAGAGTTTCTAAAACCTTTCATTATAG

**[0185] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 34)**

CGGAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGA

ACACTAACAAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCTTCCTTCTGCCTTTTCAT  
 CTTAACCATGCATTAGTTTTAACAAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACACTGATG  
 AGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCC  
 AGTTTATTCCTTCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTA  
 GTGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAACACAC  
 ACACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTGT  
 ATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTC AAGGACTTATTA  
 TATAGAAACCTGGCCATTGTTCTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTG  
 GCAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTTTCCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAG  
 GAGTCCCACAGGGCCTGGCCCGCCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGG  
 GATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTC  
 CCGTTTCGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCTGATAGGAT  
 CGGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCCTTCGACCAAGGTGTCTGTTG  
 CTCCGTAAATAAACGTCCCCTGCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGG  
 GTAGTCCGCGGGGCATTCCGGGCGGGGCGCGAGCAGAGACAGGTGAGTT

**[0186]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор LGR5 человека, как указано в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор LGR5 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 35.

**[0187] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор LGR5 человека (SEQ ID NO: 35)**

AGGGCTATTTGTACCTCAACGAGGGCTTCTCTCCAAGAAAGCCCTGAATCCTTTTCC  
 TCCTTTTTCCTGCAGATTCACCTATAGGACACTTTTTGAAGCAAGAGCATGCATTTTCC  
 CCCTGGCGCTCTGCAGCGGTTCTCAGAGCCCAGTGTCACCTCACATAGGTGGGACTGC  
 TCTCAGTTCAGAGAGCGCTGGGACACTTAAGATGAAAAGTCCCTGGAAGTTAGCAA  
 ACAGCCATCTGTCACTCTGGCATCGATTTACTAAAAGTGA CTCTAGGGTATTCTAA  
 ACCACTTTTAAAAACAAATGAGTCACTTCGACTTCCTCACCCCGCAAGAGATAGGA  
 AGGCAGCAGTGGAGTGCTCGCTCAGGAGCTGATTTGTTTAGCGATTAGCCTAGAGC  
 TTTGATTTTAGGGCAAAGCGAGCCAGACAGTGCGGCAGACGTAAGGATCAAAAAG  
 GCCACCTATCATTCGCCGGGGACGCCTGCCTCCTTACCCTGATAACGTAACCTATTTCT  
 CTGCATAGGATTTTAGTTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTATTCTGTTTAATCACTTCAA  
 GTATCTCATCCATTATTTGAAGCGGGCTCGGAGGAAACGTGCCGCATCCTCCAGTCC

TTGTGCGTCTGTTTAGGTCTCTCCGAAGCAGGTCCCTCTCGACTCTTAGATCTGGGTC  
 TCCAGCACGCATGAAGGGGTAAGGGTGGGGGGTCCCCTATTCCGGCGCGCGGCGT  
 TGAGCACTGAATCTTCCAGGCGGAGGCTCAGTGGGAGCGCCGAGAACTCGCCAGTA  
 CCGCGCGCTGCCTGCTGCCTGCTGCCTCCCAGCCCAGGACTTGGGAAAGGAGGGAG  
 GGGACAAGTGGAGGGAAAGTGGGGCCGGGGCGGGGGGTGCCTGGGAAGCCAGGCTG  
 CGCTGACGTCACTGGGCGCGCAATTCGGGCTGGAGCGCTTTAAAAACGAGCGTGC  
 AAGCAGAGATGCTGCTCCACACCGCTCAGGCCGCGAGCAGCAGCAAGGCGCACCGC  
 CACTGTCGCCGCTGCAGCCAGGGCTGCTCCGAAGGCCGGCGTGGCGGCAACCGGCA  
 CCTCTGTCCCCGCCGCGCTTCTCCTCGCCGCCACGCCGTGGGGTCAGGAACGCGGC  
 GTCTGGCGCTGCAGACGCCCGCTGAGTTGCAGAAGCCCACGGAGCGGCGCCCGGCG  
 CGCCACGGCCCGTAGCAGTCCGGTGCTGCTCTCCGCCCGCGTCCGGCTCGTGGCCCC  
 СТАКТTCGGGCACCGACCGGT

**[0188]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор SYN1 человека, как указано в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор SYN1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 36.

**[0189] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SYN1 человека (SEQ ID NO: 36)**

TGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTA  
 CCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGC  
 GCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGGCGAGGCGCGTGC  
 CTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGGCGCGGCCAC  
 CGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCC  
 CTTCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCCAC  
 GCGAGGCGCGAGATAGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGGCGCCGGCG  
 ACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGA  
 GCGCAGTCGAGAA

**[0190]** В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор GFAP человека, как указано в SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах

осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор GFAP человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 37.

**[0191] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор GFAP человека (SEQ ID NO: 37)**

CCCACCTCCCTCTCTGTGCTGGGACTCACAGAGGGAGACCTCAGGAGGCAGTCTGTC  
CATCACATGTCCAAATGCAGAGCATAACCCTGGGCTGGGCGCAGTGGCGCACAATCG  
TAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGATGTGGAAGGATCACTTGAGCCCAGAAGTTCTA  
GACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGACCCTATCTCTACAAAAAAGTTAAAAAATCA  
GCCACGTGTGGTGACACACACCTGTAGTCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAGGTGAGG  
GGATCACTTAAGGCTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGTCGTGGTTGCGCCACTGCA  
CTCCAGCCTGGGCAACAGTGAGACCCTGTCTCAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGG  
GGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGC  
AAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAG  
TGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCC  
CGCCGCACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCATTGAGCAGGGGGCTT  
GCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCC  
TAGGGGCTGCCCTTGTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCA  
GCCTGTGCCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCA  
GGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGA  
GGGGACTGGGCAGGGTTCTGACCCTGTGGGACCAGAGTGGAGGGCGTAGATGGACC  
TGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGCCCAGGTCTCAGGCTCCTAGTTGGGCCCAGTGG  
CTCCAGCGTTTCCAAACCCATCCATCCCCAGAGGTTCTTCCCATCTCTCCAGGCTGAT  
GTGTGGGAACTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACGGAGGGGTGGCCAGGGA  
AACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGTAACGGC  
TTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAA  
GGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGA  
GAGTGCCGGCCCCCTTGGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGAT  
TGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATCCCAGCCCCCAGCCCCAGAACTCCAG  
GGAATGAATGGGCAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCAAGGGAAGGACTC  
CAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAAATGAGGTGGCCCTTGGAGGTACA  
GAACAGGTTTCTTTCGCCAAATCCCAGCACCTTGCAGGCACTTACAGCTGAGTG  
AGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTG  
GTACAGCCCTTCCCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTGTT  
GCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTACTGGGCTCA

AGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCCC  
 ACTCAGCCCTTTCTTTCCTTTTTTAATTGATGCATAATAATTGTAAGTATTCATCATGG  
 TCCAACCAACCCTTTCTTGACCCACCTTCTAGAGAGAGGGTCTCTTGCTTCAGCG  
 GTCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTT  
 GGCGTGCCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAG  
 CTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGT  
 GTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCCCTCCTTCATAAAGCCCTCGC  
 ATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCT  
 GCTCGC

### Энхансеры

**[0192]** В некоторых случаях конструкция может содержать последовательность энхансера. Термин «энхансер» относится к нуклеотидной последовательности, которая может повышать уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющей интерес белок (например, белок кларин 1). Последовательности энхансеров (как правило, длиной 50-1500 тысяч пар оснований), как правило, повышают уровень транскрипции, обеспечивая дополнительные сайты связывания для белков, связанных с транскрипцией (например, факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера находится в последовательности интрона. В отличие от последовательностей промоторов, последовательности энхансеров могут действовать на гораздо большем расстоянии от сайта начала транскрипции (например, по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и/или энхансер SV40. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит энхансер CMV, примером которого является SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности энхансера, представленной SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления энхансер, полученный из SV-40, представляет собой последовательность Т-интрона SV-40, примером которой является SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности энхансера, представленной SEQ ID NO: 39.

### **[0193] Иллюстративный энхансер CMV (SEQ ID NO: 38)**

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA  
 GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC  
 CGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC

CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT  
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG

**[0194] Иллюстративный синтетический интрон SV-40 (SEQ ID NO: 39)**

GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCCG  
 CCCC GGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCT  
 CCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGC  
 GTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGG  
 GGGTGC GTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGG  
 CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGA  
 GGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACA  
 AAGGCTGCGTGC GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGC  
 GGTCGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGG  
 CTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG  
 GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGG  
 GCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGGCGCGGC  
 GAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGC GAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTT  
 GTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCG  
 GGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCT  
 TCGTGC GTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCG  
 GGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTG  
 TGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACA  
 G

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

**[0195]** В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе конструкций может включать нетранслируемую область (UTR), такую как 5'-UTR или 3'-UTR. UTR гена транскрибируются, но не транслируются. 5'-UTR начинается с места начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не включает стартовый кодон. 3'-UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Регуляторные и/или контрольные признаки UTR могут быть включены в любую из конструкций, композиций, наборов или способов, описанных в данном документе, для усиления или иного модулирования экспрессии белка кларина 1.

**[0196]** Природные 5'-UTR включают последовательность, которая играет роль в

инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления 5' UTR может содержать последовательности, такие как последовательности Козак, которые, как известно, задействованы в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR (A/G) CCAUGG, где R представляет собой пурин (А или G) на три основания выше по ходу транскрипции от стартового кодона (AUG), а за стартовым кодоном следует еще один «G». Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

**[0197]** В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR включен в любую из конструкций, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры 5'-UTR, в том числе из следующих генов: альбумина, сывороточного амилоида А, аполипопротеина А/В/Е, трансферрина, альфа-фетопропротеина, эритропоэтина и фактора VIII, можно использовать для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК.

**[0198]** В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улитке, может быть включена в любую из описанных в данном документе конструкций, композиций, наборов и способов. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR получена из эндогенных локусов гена CLRN1 и может включать всю или часть эндогенной последовательности, примером которой является SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления последовательность 5'-UTR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична 5'-UTR, представленной SEQ ID NO: 40.

**[0199]** 3'-UTR обнаруживаются непосредственно на 3'-конце стоп-кодона представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улитке, может быть включена в любую из описанных в данном документе конструкций, композиций, наборов и способов. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR получена из эндогенных локусов гена CLRN1 и может включать всю или часть эндогенной последовательности, примером которой является SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'-UTR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична 3'-UTR, представленной SEQ ID NO: 41.

**[0200]** 3'-UTR, как известно, содержат участки аденозинов и уридинов (в форме РНК) или тимидинов (в форме ДНК). Эти богатые AU сигнатуры особенно распространены в генах с высоким уровнем оборота. На основе их особенностей последовательности и функциональных свойств, богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (см., например, Chen et al., *Mol. Cell. Biol.* 15:5777-5788, 1995; Chen et al., *Mol. Cell Biol.* 15:2010-2018, 1995, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки): ARE класса I содержат несколько рассеянных копий мотива AUUUA в областях,

богатых U. Например, мРНК с-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II имеют два или более перекрывающихся нонамеров UUAUUUA (U/A) (U/A). мРНК ГМ-КСФ и ФНО-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III менее четко определены. Эти богатые U области не содержат мотива AUUUA, двумя хорошо изученными примерами этого класса являются мРНК с-Jun и миогенина.

**[0201]** Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мессенджер, тогда как члены семейства ELAV, в первую очередь HuR, были задокументированы как повышающие стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование сайтов связывания, специфичных для HuR, в 3' UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, стабилизации сообщения *in vivo*.

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления введение, удаление или модификация ARE 3'-UTR может использоваться для модуляции стабильности мРНК, кодирующей белок кларин 1. В других вариантах осуществления ARE могут быть удалены или мутированы для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличения трансляции и продукции белка кларин 1.

**[0203]** В других вариантах осуществления последовательности, не являющиеся ARE, могут быть включены в 5'- или 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления интроны или части интронных последовательностей могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любом из конструкций, наборов и способов, представленных в данном документе. Включение интронных последовательностей может увеличивать продукцию белка, а также уровни мРНК.

**[0204] Иллюстративная последовательность 5'-UTR (SEQ ID NO: 40)**

AGGAGATACTTGAAGGCAGTTTGAAGACTTGTTTTACAGATTCTTAGTCCAAAGAT  
TTCCAATTAGGGAGAAGAAGCAGCAGAAAAGGAGAAAAGCCAAGTATGAGTGATG  
ATGAGGCCTTCATCTACTGACATTTAACCTGGCGAGAACCGTCGATGGTGAAGTTGC  
STTTTCAGCTGGGAGCTGTCCGTTCCAGCTTCCGTAATAAATGCAGTCAAAGAGGCAG  
TCCSTTCCCATTTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTTGAACCTCGCCCTCACAGAAGCCGTT  
TCTCATC

**[0205] Иллюстративная последовательность 3'-UTR (SEQ ID NO: 41)**

AAGGCAAACSTTTCTATAATTTTACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTTAGA  
TGTGGTTAATTTTGCATATCSTTTTAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCSTTCG  
TGACAATGTTTACAAATTACGТАCTAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAGCAG  
AAGGAAGGCTTTGAAAAGTTGTTTTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGTAGTC  
AAAGGCAGTTGACTAGAATCGACAAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTGTGTG

TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAGATGTCTTCCTATCAAAAAGATATCAAAGGCACATG  
 GAATATATTTTAATAAAAAACAAATAATATCTCTAATATATCCACACATTTGTTGCCA  
 GATTCAGAAAAGCTGAGCTGCAATCGCTTTCCTAAAACAGTAGTGTATTAATGAAC  
 ATCTATAAAATGTATCAACACACATTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCTTAGG  
 CCAGGCGTGGTGACTCACACCTGTAATTCCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTGGGAA  
 GATCATTTGAGTTCAGGAGTTCGAGTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACCCTGTC  
 ACTAACAAAATTAATAAAATAAAATAAATATAAAATATAGGCTTTAAAAAAGCATAG  
 TCTTATTAACCATGTCTGTTGGTCAAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAAGAAG  
 AAAAAACCAACGTTAGGGTATTTTTCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATTCACG  
 ACAGTACTTTCAATGAACATAATTGTTAGGACCACTGAGGAATCATGAAAAATGAT  
 CTCTGCTTAGTACATTTGATGCAAAATGACTTATTAGGGGCTGTTTTTCTAGCTATAG  
 TGTCTCGAGTACTAATATGCAATTATGAAAATTATATTAATCTGGGATTATGACGG  
 TATCACTGTATCATCTTGGTCTTGTCTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGTCAACT  
 TTTTTTTCCCTGAATTACCCATCAAATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCACAGCT  
 GAGCCTGGAACTGACCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCTCCAGAAAGCACCAA  
 GGAAAAGCAGAGAATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAGGTGCTG  
 AGTACTCAGCAGCCCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAAACACTG  
 TTTCCCTTTGGAACSTATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAATAACTTG  
 CTCTGGTGTCAATTCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTTTCCAGAT  
 GCT

*Внутренние сайты посадки рибосомы (IRES)*

[0206] В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая белок кларин 1, может включать внутренний сайт посадки рибосомы (IRES). IRES образует формирует сложную вторичную структуру, которая позволяет инициировать трансляцию из любого положения с мРНК, расположенной непосредственно ниже по ходу трансляции от того места, где находится IRES (см., например, Pelletier and Sonenberg, *Mol. Cell. Biol.* 8(3):1103-1112, 1988).

[0207] Специалистам в данной области техники известно несколько последовательностей IRES, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), риновируса человека (HRV), вируса паралича свержка, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита С (HCV) и полиовируса (PV) (см., например, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002; and Hellen et al., *Genes Dev.* 15(13):1593-612, 2001, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

**[0208]** В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES, включенная в конструкцию, которая кодирует белок кларин 1 или С-концевую часть белка кларин 1, представляет собой последовательность 2А вируса ящура (FMDV). Последовательность вируса ящура 2А представляет собой небольшой пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (см., например, 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, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Активность расщепления последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и конструкции для генной терапии (AAV и ретровирусы) (см., например, 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; and 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 II: 1921-1931, 2000; и Klump et al., Gene Therapy 8:811-817, 2001, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

**[0209]** IRES может быть использован в конструкции AAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая С-концевую часть белка кларин 1, может содержать полинуклеотидный внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES может быть частью композиции, включающей более одной конструкции. В некоторых вариантах осуществления IRES используется для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена.

#### Сайты сплайсинга

**[0210]** В некоторых вариантах осуществления любая из представленных в данном документе конструкций может включать последовательности сплайс-донора и/или сплайс-акцептора, которые являются функциональными в ходе процессинга РНК, происходящего во время транскрипции. В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга вовлечены в транс-сплайсинг.

**[0211] Иллюстративный интрон сплайс-донора (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 42)**

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTC  
GAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT

**[0212] Иллюстративный интрон сплайс-акцептора (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 43)**

GATAGGCACSTATTTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCSTTTCTCTCCACAG

#### Последовательности полиаденилирования

**[0213]** В некоторых вариантах осуществления конструкция, представленная в данном документе, может содержать сигнальную последовательность полиаденилирования (поли(А)). Большинство зарождающихся эукариотических мРНК имеют поли(А)-хвост на своем 3'-конце, который добавляется во время сложного процесса, который включает расщепление первичного транскрипта и реакцию связанного полиаденилирования, вызванную сигнальной последовательностью поли(А) (см., например, Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Поли(А)-хвост придает мРНК стабильность и транспортируемость (см., например, Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(А) расположена на 3' конце от кодирующей последовательности.

**[0214]** Используемый в данном документе термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например, 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, содержащим определенную последовательность, например, поли(А)-сигнал. Поли(А)-хвост и связанные с ним белки помогают защитить мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также играет определенную роль в терминации транскрипции, экспорте мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование, как правило, происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может также происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

**[0215]** Используемый в данном документе термин «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.

**[0216]** Существует несколько сигнальных последовательностей поли(А), которые можно использовать, в том числе полученные из бычьего гормона роста (bGH) (см.,

например, Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 81(13):3944-3948, 1984; патент США №5 122 458, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки),  $\beta$ -глобина мыши,  $\alpha$ -глобина мыши (см., например, Orkin et al., EMBO J 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood 71(2):313-319, 1988, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), коллагена человека, вируса полиомы (см., например, Batt et al., Mol. Cell Biol. 15(9):4783-4790, 1995, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV ТК), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), гормона роста человека (hGH) (см., например, Szymanski et al., Mol. Therapy 15(7):1340-1347, 2007, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), группы, состоящей из сайта поли(A) SV40, такого как позднего и раннего сайта поли(A) SV40 (см., например, Schek et al., Mol. Cell Biol. 12(12):5386-5393, 1992, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

**[0217]** Сигнальная последовательность поли(A) может представлять собой ААТААА. Последовательность ААТААА может быть замещена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными ААТААА и способными сигнализировать полиаденилирование, включая АТТААА, АГТААА, САТААА, ТАТААА, ГАТААА, АСТААА, ААТАТА, ААГААА, ААТААТ, АААААА, ААТГАА, ААТСАА, ААСААА, ААТСАА, ААТААС, ААТАГА, ААТТАА или ААТААГ (см., например, WO 06/12414, который полностью включен в данный документ посредством ссылки).

**[0218]** В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) может быть синтетическим сайтом полиаденилирования (см., например, конструкцию для экспрессии pCl-neo Promega, которая основана на публикации Levitt et al., Genes Dev. 3(7):1019-1025, 1989, полностью включенной в данный документ путем ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропилина-1 (sNRP) (АААТААААТАСГАААТГ) (см., например, WO 05/073384, который включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) содержит сайт поли(A) SV40 или состоит из него. В некоторых вариантах осуществления сигнал поли(A) содержит или состоит из SEQ ID NO: 45. 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: 44. Дополнительные примеры сигнальных последовательностей поли(A) известны в данной области техники. В некоторых вариантах

осуществления последовательность поли(А) по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности поли(А), представленной SEQ ID NO: 44 или 45.

**[0219] Иллюстративная сигнальная последовательность bGH поли(А) (SEQ ID NO: 44)**

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC  
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCCATAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA  
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG  
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

**[0220] Иллюстративная сигнальная последовательность поли(А) SV40 (SEQ ID NO: 45)**

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC  
ACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG  
TATCTTA

Дополнительные последовательности

**[0221]** В некоторых вариантах осуществления конструкции по настоящему изобретению могут содержать элемент или последовательность T2A. В некоторых вариантах осуществления конструкции по настоящему изобретению могут включать один или более сайтов клонирования. В некоторых таких вариантах осуществления сайты клонирования могут быть удалены не полностью перед изготовлением для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления сайты клонирования могут играть функциональную роль, в том числе в качестве линкерных последовательностей или частей сайта Козак. Как будет понятно специалистам в данной области техники, сайты клонирования могут значительно различаться по первичной последовательности, сохраняя при этом желаемую функцию. В некоторых вариантах осуществления конструкции могут содержать любую комбинацию сайтов клонирования, иллюстративные сайты клонирования представлены SEQ ID NO: 46-56.

**[0222] Иллюстративный сайт клонирования А (SEQ ID NO: 46)**

TTGTTCGACGCGGCCCGCACGCGT

**[0223] Иллюстративный сайт клонирования В (SEQ ID NO: 47)**

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTCGCTAGCCACC

**[0224] Иллюстративный сайт клонирования С (SEQ ID NO: 48)**

TAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

**[0225] Иллюстративный сайт клонирования D (SEQ ID NO: 49)**

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGTCCTAGG

**[0226] Иллюстративный сайт клонирования E (SEQ ID NO: 50)**

GCGGCCGCACGCGT

**[0227] Иллюстративный сайт клонирования F (SEQ ID NO: 51)**

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC

**[0228] Иллюстративный сайт клонирования G (SEQ ID NO: 52)**

TAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

**[0229] Иллюстративный сайт клонирования H (SEQ ID NO: 53)**

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT

**[0230] Иллюстративный сайт клонирования I (SEQ ID NO: 54)**

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGT

**[0231] Иллюстративный сайт клонирования J (SEQ ID NO: 55)**

GCCACC

**[0232] Иллюстративный сайт клонирования K (SEQ ID NO: 56)**

TAAGAGCTC

#### Домены дестабилизации

**[0233]** В некоторых вариантах осуществления любая из представленных в данном документе конструкций может необязательно включать последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен («дестабилизирующая последовательность») для временного контроля экспрессии белка. Неограничивающие примеры дестабилизирующих последовательностей включают последовательности, кодирующие последовательность FK506, последовательность дигидрофолатредуктазы (DHFR) или другие иллюстративные дестабилизирующие последовательности.

**[0234]** В отсутствие стабилизирующего лиганда белковая последовательность, функционально связанная с дестабилизирующей последовательностью, расщепляется путем убиквитинирования. Напротив, в присутствии стабилизирующего лиганда деградация белка ингибируется, тем самым обеспечивая активную экспрессию белковой последовательности, функционально связанной с дестабилизирующей последовательностью. В качестве положительного контроля для стабилизации экспрессии белка экспрессия белка может быть обнаружена обычными способами, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы; анализы сортировки флуоресцентно активируемых клеток (FACS); иммунологические анализы (например, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

**[0235]** Дополнительные примеры дестабилизирующих последовательностей известны в

данной области техники. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность белка, связывающего FK506 и рапамицин (FKBP12), а стабилизирующий лиганд представляет собой Shield-1 (Shld1) (см., например, Banaszynski et al. (2012) Cell 126(5): 995-1004, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность DHFR, а стабилизирующий лиганд представляет собой триметоприм (TMP) (см., например, Iwamoto et al. (2010) Chem Biol 17:981-988, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

**[0236]** В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность FKBP12, и присутствие конструкции AAV, несущей ген FKBP12, в клетке субъекта (например, поддерживающей наружной волосковой клетке улитки) выявляют с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующую последовательность можно использовать для проверки временно специфичной активности любой из описанных в данном документе конструкций AAV.

**[0237] Иллюстративная аминокислотная последовательность, дестабилизирующая DHFR (SEQ ID NO: 57)**

MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK  
NIILSSQPSTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAE  
VEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

**[0238] Иллюстративная нуклеотидная последовательность, дестабилизирующая DHFR (SEQ ID NO: 58)**

GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAAC  
GCCATGCCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAAT  
AAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGA  
CGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGT  
GAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGA  
TTGGCGGCGGTTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGTATCTGA  
CGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGAT  
GACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAG  
СТАТТГСТТТГАГАТТСТГГАГСГГСГАТАА

**[0239] Иллюстративный дестабилизирующий домен (SEQ ID NO: 59)**

ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATG  
CCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCC

GTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTTCGTCCTCGTTGCCAGGACGCAA  
 AAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGT  
 CGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGC  
 GGCGGTTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGTATCTGACGCAT  
 ATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGATGACTG  
 GGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTG  
 CTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA

**[0240] Иллюстративная аминокислотная последовательность, дестабилизирующая FKBP12 (SEQ ID NO: 60)**

MGVEKQVIRPGNGPKPAPGQTVTVHCTGFGKDGDLSQLKFWSTKDEGQKPFQIGKGA  
 VIKGWDEGVIGMQIGEVARLRCSSEYAYGAGGFPAWGIQPNSVLDLFEIEVLSVQ

Репортерные последовательности или элементы

**[0241]** В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе конструкции могут необязательно включать последовательность, кодирующую репортерный полипептид и/или белок («репортерная 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. Дополнительные примеры репортерных последовательностей известны в данной области техники. При связывании с контрольными элементами, которые управляют их экспрессией, репортерная последовательность может обеспечивать сигналы, обнаруживаемые обычными способами, включая ферментативный, рентгенографический, колориметрический, флуоресцентный или другие спектрографические исследования; анализы сортировки флуоресцентно активируемых клеток (FACS); иммунологические анализы (например, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

**[0242]** В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой ген LacZ, и присутствие конструкции, несущей ген LacZ, в клетке млекопитающего (например, волосковой клетке улитки) определяется с помощью анализов на активность бета-галактозидазы. Когда репортер представляет собой флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок) или люциферазу, присутствие конструкции, несущей флуоресцентный белок или люциферазу, в клетке млекопитающего (например, волосковой клетки улитки) может быть измерено флуоресцентными методами

(например, флуоресцентной микроскопией или FACS) или продуцирование света в люминометре (например, спектрофотометре или приборе для визуализации IVIS). В некоторых вариантах осуществления репортерную последовательность можно использовать для проверки способности к нацеливанию на тканевую специфичность и регуляторную и/или контрольную активность тканеспецифичного промотора любой из конструкций, описанных в данном документе.

**[0243]** В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой метку FLAG (например, метку 3xFLAG) и присутствие конструкции, несущей метку FLAG, в клетке млекопитающего (например, клетке внутреннего уха, например, волоске улитки или поддерживающей клетке, например, клетке глаза) выявляется с помощью анализов связывания с белками или обнаружения (например, вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, радиоиммуноанализа (РИА), масс-спектрометрии). Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG представлена как SEQ ID NO: 61.

**[0244] Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG (SEQ ID NO: 61)**

GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGA  
CTACAAGGATGACGATGACAAG

### **Частицы AAV**

**[0245]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены частицы AAV, которые содержат конструкцию, кодирующую ген CLRN1 или его характерную часть, описанную в данном документе, и капсид, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV могут быть описаны как имеющие серотип, который представляет собой описание штамма конструкции и капсидного штамма. Например, в некоторых вариантах осуществления частица AAV может быть описана как AAV2, причем частица имеет капсид AAV2 и конструкцию, которая содержит характерные 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, в которой используется ITR AAV2 и капсид AAV9.

### **Конструкция AAV**

**[0246]** В настоящем изобретении предложены полинуклеотидные конструкции, которые содержат ген CLRN1 или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, полинуклеотид, содержащий ген CLRN1 или его характерную часть, может быть включен в частицу AAV.

**[0247]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная конструкция содержит один или более компонентов, полученных из встречающейся в природе геномной конструкции AAV или модифицированных из нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность, полученная из конструкции AAV, представляет собой конструкцию AAV1, конструкцию AAV2, конструкцию AAV3, конструкцию AAV4, конструкцию AAV5, конструкцию AAV6, конструкцию AAV7, конструкцию AAV8, конструкцию AAV9, конструкцию AAV2.7m8, конструкцию AAV8BP2, конструкцию AAV293 или конструкцию AAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV Anc80 представляет собой капсид гAAV Anc80L65. Дополнительные иллюстративные конструкции AAV, которые можно использовать в данном документе, известны в данной области техники (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; каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

**[0248]** В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции содержат кодирующую последовательность, например, ген CLRN1 или его характерную часть, одну или более регуляторных и/или контрольных последовательностей и, необязательно 5' и 3' AAV инвертированные концевые повторы (ITR), полученные из AAV. В некоторых вариантах осуществления, в которых используется 5' и 3' ITR, полученный из AAV полинуклеотидная конструкция может называться рекомбинантной конструкцией AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции гAAV упакованы в капсид AAV с образованием частицы AAV.

**[0249]** В некоторых вариантах осуществления последовательности, полученные из AAV (которые входят в состав полинуклеотидной конструкции), обычно включают цис-действующие 5' и 3'-последовательности ITR (см., например, B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses," ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168, 1990, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Иллюстративные последовательности ITR, полученные из AAV2, имеют длину около 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% иллюстративной последовательности ITR (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%) включено в конструкцию, представленную в данном документе. Возможность модифицировать эти последовательности ITR находится в пределах данной области техники. (см., например, такие тексты, как Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; and K. Fisher et al., *J. Virol.* 70:520-532, 1996, каждый из которых полностью включен в качестве ссылки). В некоторых вариантах

осуществления любая из кодирующих последовательностей и/или конструкций, описанных в данном документе, фланкирована 5' и 3'-последовательностями ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV.

**[0250]** В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные конструкции, описанные в соответствии с настоящим раскрытием и по схеме, известной в данной области техники (см., например, Asokan et al., *Mol. Ther.* 20: 699-7080, 2012, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), обычно состоят из кодирующей последовательности или ее части, по меньшей мере одной и/или контрольной последовательности, и, необязательно 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции могут быть упакованы в капсид для создания частицы AAV. Частица AAV может быть доставлена в выбранную клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции содержат дополнительную необязательную кодирующую последовательность, которая представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты (например, ингибиторную последовательность нуклеиновой кислоты), гетерологичную последовательностям конструкции, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой представляющий интерес генный продукт. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, функционально связана с компонентами и/или контрольными компонентами таким образом, который обеспечивает транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию кодирующей последовательности в клетке ткани-мишени.

**[0251]** Как показано на **фиг. 1А**, немодифицированный эндогенный геном AAV включает две открытые рамки считывания, «сар» и «гер», которые фланкированы ITR. Как показано на **фиг. 1В**, иллюстративные конструкции гAAV аналогичным образом включают ITR, фланкирующие кодирующую область, например, кодирующую последовательность (например, ген **CLRN1**). В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV также содержит традиционные контрольные элементы, которые функционально связаны с кодирующей последовательностью таким образом, который обеспечивает ее транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидной конструкцией или инфицированной вирусом, полученным в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV необязательно содержит промотор (показан на **фиг. 1В**), энхансер, нетранслируемую область (например, 5'-UTR, 3'-UTR), последовательность Козак, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES),

сайты сплайсинга (например, акцепторный сайт, донорный сайт), сайт полиаденилирования (показан на **фиг. 1В**) или любую их комбинацию. Такие дополнительные элементы описаны далее в данном документе.

**[0252]** В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию гAAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV может включать по меньшей мере 500 т.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 конструкция AAV может включать не более 7,5 т.п.н., не более 7 т.п.н., не более 6,5 т.п.н., не более 6 т.п.н., не более 5,5 т.п.н., не более 5 т.п.н., не более 4,5 т.п.н., не более 4 т.п.н. не более 3,5 т.п.н., не более 3 т.п.н. или не более 2,5 т.п.н.. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV может включать от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н. или от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н.

**[0253]** Любая из конструкций, описанных в данном документе, может дополнительно включать регуляторную и/или контрольную последовательность, например контрольную последовательность, выбранную из группы последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли(A)), консенсусной последовательности Козак и/или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифичный промотор. Неограничивающие примеры контрольных последовательностей описаны в данном документе.

#### Капсиды AAV

**[0254]** В настоящем изобретении предложена одна или более полинуклеотидных конструкций, упакованных в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой или получен из капсида AAV серотипа AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, rh8, rh10, rh39, rh43 или Anc80 или одного, или более их гибридов. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV из наследственного серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой наследственный (Anc) капсид AAV. Капсид Anc создается из последовательности конструкции, построенной с использованием

эволюционных вероятностей и эволюционного моделирования для определения вероятной наследственной 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).

**[0255]** В некоторых вариантах осуществления капсид AAV создается с использованием матричной кодирующей последовательности нуклеотидов, содержащей SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, представленный SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична полипептиду, представленному SEQ ID NO: 63.

**[0256]** Как предусмотрено в данном документе, любая комбинация капсидов AAV и конструкций AAV (например, включающих ITR AAV) может быть использована в рекомбинантных частицах AAV (rAAV) по настоящему изобретению. Например, ITR дикого типа или варианта AAV2 и капсид Anc80, ITR дикого типа или варианта AAV2 и капсид AAV6 и т. д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV полностью состоит из компонентов AAV2 (например, капсид и ITR представляют собой серотип AAV2). В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV2/6, AAV2/8 или AAV2/9 (например, капсид AAV6, AAV8 или AAV9 с конструкцией AAV, имеющей ITR AAV2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV представляет собой частицу AAV2/Anc80, которая содержит капсид Anc80 (например, содержащий полипептид SEQ ID NO: 63), который инкапсулирует конструкцию AAV с ITR AAV2 (например, SEQ ID NO: 15-22), фланкирующие часть кодирующей последовательности, например, ген CLRN1 или его характерную часть (например, SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4). Другие частицы AAV известны в данной области техники и описаны, например, в Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления последовательность капсида по меньшей мере на 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 99 % идентична нуклеотидной или аминокислотной последовательности капсида, представленной SEQ ID NO: 62 или 63 соответственно.

**[0257]** В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе подход к доставке через платформу объединяет библиотеку синтетических капсидов AAV, известных как наследственные капсиды AAV (AAVAnc), которые воссоздают эволюционную линию современных встречающихся в природе вирусов. В некоторых вариантах осуществления эти капсиды AAV сочетаются с новой минимально инвазивной

процедурой введения для доставки продуктов-кандидатов непосредственно в улитку. В некоторых вариантах осуществления в подходе к доставке используется вариант капсида AAV Anc80 из этой библиотеки (например, Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления такой капсид используется для создания частицы гAAV, при этом такая частица создается путем добавления конструкции, как описано в настоящем документе, например, конструкции, содержащей кДНК CLRN1, кодирующую белок CLRN1, как описано в настоящем документе, для создания частицы гAAV Anc80-CLRN1.

**[0258]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, содержит капсид AAV Anc80, который представляет собой рационально сконструированный синтетический капсид AAV, последовательность которого была установлена путем реконструкции наследственной последовательности. Реконструкция наследственной последовательности использует доступную информацию о последовательности встречающихся в природе аденоассоциированных вирусов и в результате филогенетического и статистического прогнозирования идентифицирует наследственное состояние последовательности в различных промежуточных эволюционных узлах. Во время создания AAV Anc80 девять узлов были реконструированы, а производные *in silico* последовательности линии AAV были синтезированы *de novo* и охарактеризованы. Это привело к идентификации узла библиотеки Anc80 (Anc80Lib), предполагаемого предка широко изученных серотипов AAV 1, 2, 8 и 9. Последовательности белка Anc80Lib впоследствии были обратно транслированы и созданы путем генного синтеза, а отдельные клоны оценивали отдельно по упаковке, инфекционности и биологическим свойствам. В некоторых вариантах осуществления и на основании этих результатов для дальнейшей характеристики был выбран AAV Anc80, 65-й клон Anc80Lib (Anc80L65). Вариант капсида AAV Anc80 имеет отличительный состав; хотя последовательности AAV8 и AAV2 отличаются только примерно на 9% и 12% соответственно от AAV Anc80, структурное моделирование AAV Anc80 показало, что около 20% внешней поверхности его частиц отличается от известных циркулирующих AAV таким образом, что распределены по поверхности капсида (см., например, Zinn 2015, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0259]** В некоторых вариантах осуществления эффективность AAV Anc80 в качестве частиц для генной терапии была охарактеризована *in vivo*, и частицы гAAV, содержащие AAV Anc80, продемонстрировали способность действовать в качестве широко применимой частицы для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления исследования, проведенные на мышах и приматах, отличных от человека (NHP), показали, что AAV Anc80 обладает такой же эффективностью трансдукции, что и AAV8, при нацеливании на печень

после внутривенной инъекции без явных признаков системной токсичности (см., например, Zinn 2015; Murillo 2019, каждый из которых полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления AAV Anc80 продемонстрировал тропизм и эффективную трансдукцию переднего сегмента глаза мыши (Wang 2017, полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки), сетчатки мыши и NHP (см., например, Zinn 2015; Carvalho 2018, каждый из которых полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки), скелетных мышц мыши (см., например, Zinn 2015, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки), центральной нервной системы (ЦНС) мыши путем системной и интрапаренхиматозной доставки (Hudry 2018, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки), и мышью почки (см., например, Ikeda 2018, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0260]** В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в настоящем документе (например, содержащие гAAV-CLRN1), содержат капсид AAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV Anc80 представляет собой капсид гAAV Anc80L65. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV Anc80 демонстрирует высокую эффективность трансдукции для кохлеарных и вестибулярных клеток. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV Anc80 демонстрирует высокую эффективность трансдукции клеток глаза.

**[0261]** AAV Anc80 представляет собой рационально сконструированный капсид AAV, последовательность которого была установлена путем реконструкции наследственной последовательности (см., например, Zinn 2015, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). Реконструкция наследственной последовательности использует доступную информацию о последовательности встречающихся в природе AAV и в результате филогенетического и статистического прогнозирования идентифицирует наследственное состояние последовательности в различных промежуточных эволюционных узлах. Как описано в литературе, синтез *de novo* и характеристика полученных *in silico* последовательностей линии AAV привели к идентификации узла библиотеки Anc80 (Anc80Lib), предполагаемого предка широко изученных серотипов AAV 1, 2, 8 и 9. Последующая оценка последовательностей Anc80Lib привела к дальнейшей характеристике AAV Anc80, 65-го клона Anc80Lib (Anc80L65). Эти исследования показали, что вариант капсида AAV Anc80 имеет отличительный состав с расходящимся распределением частиц на внешней поверхности, что дает стабильный и функциональный вариант AAV с такой же эффективностью трансдукции, как и у AAV8 (см., например, Zinn 2015, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). Первое сообщение о применении AAV Anc80 во внутреннем ухе млекопитающих выявило

высокую эффективность трансдукции в волосковых клетках улитки и вестибулярного аппарата (см., например, Landegger 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). Многочисленные последующие независимые исследования подтвердили повышенную эффективность трансдукции AAV Anc80 в кохлеарные и вестибулярные клетки по сравнению с другими серотипами AAV; у мышей разного возраста (см., например, Landegger 2017; Тао 2018; Yoshimura 2018; и Omichi 2020, каждый из которых полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки) и у приматов, отличных от человека (см., например, Andres-Mateos 2019, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки), AAV Anc80 обладает более высокой эффективностью трансдукции и более широким тропизмом по сравнению с рядом других капсидов AAV.

**[0262]** Генная терапия с использованием частиц AAV является многообещающим методом лечения заболеваний внутреннего уха по нескольким причинам, таким как: (1) внутреннее ухо, которое содержит слуховой и вестибулярный сенсорный эпителий, имеет модифицированный иммунный надзор, аналогичный таковому в центральной нервной системе (Fujioka 2014, полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки); (2) сенсорные и поддерживающие клетки улиткового Кортиевого органа являются постмитотическими, что допускает возможность длительной экспрессии после однократного введения AAV; и (3) совокупный клинический опыт доставки гAAV как взрослым, так и детям несколькими путями введения предполагает сильный профиль безопасности для AAV в качестве средства доставки, особенно при локализованной доставке и/или в низких и умеренных дозах.

**[0263]** Начиная с первоначальных клинических испытаний более двух десятилетий назад, частицы гAAV вводили сотням участников в десятках клинических испытаний в дозах примерно до  $1 \times 10^{15}$  vg или более для системного введения (см., например, Flotte 1996; Flotte 2013; Parente 2018 и Wang 2019, каждая из которых полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки). Количество испытаний, в которых частицы AAV использовались для переноса генов *in vivo*, неуклонно растет. Профиль безопасности вместе с высокой эффективностью трансдукции широкого спектра тканей-мишеней сделал частицы гAAV предпочтительной платформой для генной терапии *in-vivo* (см., например, Wang 2019, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). Успешное применение технологии гAAV было достигнуто в клинике при различных состояниях, включая нарушения свертывания крови, наследственную слепоту и нейродегенеративные заболевания (см., например, Colella 2018; и Wang 2019, каждое из которых включено в настоящий документ полностью ссылкой).

**[0264]** Препарат в виде частиц гAAV (алипоген типарвовек; Glybera<sup>®</sup>) был впервые

одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (ЕМА) для лечения дефицита липопротеинлипазы в 2012 году. Впоследствии были созданы два продукта гААV: воретиген непарвовек-рзил (Luxturna<sup>®</sup>) для лечения дистрофии сетчатки, связанной с подтвержденной биаллельной мутацией *RPE65*, и онасемноген абепарвовек-ксиой (Zolgensma<sup>®</sup>) для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) с биаллельными мутациями в ген *SMN1* были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2017 и 2019 годах соответственно; воретиген непарвовек-рзил (Luxturna<sup>®</sup>) был также одобрен ЕМА для лечения потери зрения вследствие наследственной дистрофии сетчатки, когда заболевание вызвано мутациями в гене *RPE65*.

**[0265]** В некоторых вариантах осуществления лекарственные средства и биологические препараты, включая частицы гААV, могут достигать многих клеток-мишеней во внутреннем ухе, доставляя их в перилимфу. Перилимфа представляет собой жидкость, очень похожую по составу (см., например, Lysaght 2011, полностью включенную в настоящий документ в качестве ссылки) и по диффузионной непрерывности на спинномозговую жидкость (СМЖ). Перилимфа омывает большую часть сенсорных, нервных и опорных клеток улитки и вестибулярной системы, расположенных в костном лабиринте внутреннего уха (**фиг. 11 и 12**). В некоторых вариантах осуществления перилимфатическое пространство улитки, в которое доставляется композиция, раскрытая в настоящем документе, например, гААV-CLRN1, содержит две лестницы или прохода: барабанную лестницу и вестибулярную лестницу, которые переходят друг в друга на вершине спирали улитки через геликотрему. Многие клетки внутреннего уха находятся в жидкостной непрерывности с перилимфой через интерстициальные пространства в ткани.

**[0266]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе также раскрыто стерильное одноразовое устройство доставки для интракохлеарного введения для доставки композиции, описанной в настоящем документе, например, гААV-CLRN1, в перилимфатическую жидкость внутреннего уха через мембрану круглого окна с вентиляционным отверстием, расположенным в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления при таком подходе к интракохлеарному введению композицию, описанную в настоящем документе, например, гААV-CLRN1, вводят в барабанную лестницу через мембрану круглого окна с отверстием в основании стремени внутри овального окна, так что композиция перфузируется через барабанную лестницу, затем через вестибулярную лестницу через соединение в геликотреме и следует по пути жидкости к отверстию в основании стремени (**фиг. 11**). В некоторых вариантах осуществления наличие вентиляционного отверстия, отличного от инъекционного порта, обеспечивает более

равномерное распределение лекарственного средства по длине улитки и предотвращает вредное накопление дополнительного давления жидкости во внутреннем ухе. В некоторых вариантах осуществления, о чем свидетельствует трансдукция вестибулярных клеток с использованием этой методики с двойным прозрачным окном, инъекцией и вентиляцией, этот подход к доставке также позволяет диффузию композиции, раскрытой в настоящем документе, например инъекционного раствора, в вестибулярную систему. В некоторых вариантах осуществления весь процесс может быть выполнен у субъекта относительно нетравматичным доступом через наружный слуховой проход; см. **фиг. 9** и Примеры для получения дополнительной информации о процедуре хирургического введения.

**[0267]** Опубликован ряд исследований по трансдукции AAV Anc80 у мышей. Различные типы вирусных векторов (например, аденовирусный вектор, вирусные векторы простого герпеса) рассматривались для доставки генов во внутреннее ухо на животных моделях (Chen 2001; Wenzel 2007; Husseman 2009, каждый из которых включен в настоящий документ в качестве ссылки); тем не менее, частицы гAAV представляются многообещающим инструментом для доставки генов непосредственно в улитку, учитывая приемлемый профиль безопасности и длительную экспрессию трансгена, включая восстановление слуховой, кохлеарной и вестибулярной функций в моделях мышей с нокаутом и нокином (см., например, Akil 2012; Kim 2016; Pan 2017; Akil 2019; Al-Moyed 2019; György 2019, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Несколько серотипов AAV были доставлены во внутреннее ухо с использованием различных хирургических подходов и доз как у новорожденных, так и у взрослых мышей (см., например, Akil 2012; Askew 2015; Chien 2016; Landegger 2017; Suzuki 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Akil 2019; Al-Moyed 2019; György 2019; Kim 2019; Omichi 2020, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Эффективность трансдукции, оцениваемая по экспрессии GFP в различных типах клеток улиткового и вестибулярного органов, различается в зависимости от постнатального возраста мыши, способа доставки частицы и оцениваемого варианта серотипа или капсида.

**[0268]** В некоторых вариантах осуществления вариант AAV Anc80 продемонстрировал высокую эффективность нацеливания на кохлеарные и вестибулярные сенсорные клетки (волосковые клетки) и вспомогательные клетки кохлеарных и вестибулярных органов у новорожденных и взрослых мышей по сравнению с другими капсидами AAV (см., например, Landegger 2017; Suzuki 2017; Omichi 2020, каждый из которых полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки). Неонатальный тропизм Anc80 и эффективность переноса гена оценивали *in vivo* у мышей C57BL/6, которым вводили в постнатальный день 1 (P1) путем введения через «круглое окно» (см., например, Landegger

2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). В соответствии с предыдущими исследованиями, AAV2, AAV6 и AAV8 были нацелены на низкий процент ИНС, а AAV1 был способен трансдуцировать ИНС с более высокой эффективностью, но трансдукция ОНС была минимальной; напротив, AAV Anc80 (1,7E9 vg/улитка) был способен преобразовывать около 100% ИНС и ~90% ОНС (**фиг. 12**) без какого-либо вредного воздействия на улитку или слуховую функцию (см., например, Landegger 2017, включенный в данный документ полностью по ссылке). В некоторых вариантах осуществления в вестибулярной системе AAV Anc80 трансдуцирует волосковые клетки маточки I и II типа, а также клетки кристы полукружного канала (**фиг. 13**), не влияя на вестибулярную функцию (см., например, Landegger 2017, вкл. в данный документ полностью по ссылке).

**[0269]** Используя другой путь введения через задний полукружный канал, тропизм AAV Anc80 и эффективность переноса генов оценивали у взрослых (7 недель) мышей CBA/CaJ (см., например, Suzuki 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). AAV Anc80 (9,6E8 vg/улитку) нацеливался на сенсорные и дополнительные клетки улитки, включая примерно 100% ИНС по всей длине улитки, а также значительную часть ОНС, клетки спирального лимба и мембраны Рейсснера, а также клетки стержня улитки (например, нейроны спирального ганглия и сателлитные глиальные клетки) (**фиг. 14**) при сохранении нормальной функции улитки и слуха (см., например, Suzuki 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки). Также были трансдуцированы несколько типов клеток вестибулярной системы, включая подмножество волосковых клеток и практически 100% поддерживающих клеток в кристах маточки и полукружного канала, а также в мешочке (**фиг. 15**), все без вредного воздействия на вестибулярную функцию (см., например, Suzuki 2017, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0270]** Совсем недавно трансдукцию AAV Anc80 *in vivo* у взрослых (4 недели) мышей C3H/HeJ оценивали с использованием пути доставки, используемого в настоящем документе (через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала), и непосредственно сравнивали с трансдукцией встречающимися в природе серотипами AAV1, AAV2, AAV8 и AAV9 (см., например, Omichi 2020, полностью включенную в настоящий документ в качестве ссылки). Все частицы вызывали некоторую степень трансдукции без вредного воздействия на слуховую функцию, о чем свидетельствуют контрольные (неинъекционные) пороги ABR. AAV Anc80 (5,5E9 vg/улитка) трансдуцировал практически 100% ИНС по длине улитки и примерно от 27 до 66% ОНС в зависимости от расположения в улитке (**фиг. 16**). Несмотря на немного более высокую

эффективность трансдукции ОНСs с помощью AAV2 (3,68E9 гв/улитка) по сравнению с AAV Anc80, AAV Anc80 сохранял значительно более широкий тропизм, чем AAV2, о чем свидетельствуют eGFP-позитивные волосковые клетки мешочка и нейроны спирального ганглия в улитке; в этих же типах клеток AAV2 практически не продуцировал трансдукцию (фиг. 16) (см., например, Omichi 2020, полностью включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

**[0271]** В некоторых вариантах осуществления способность AAV Anc80 нацеливаться на широкий спектр типов клеток внутреннего уха, включая ИНС и ОНС улитки, поддерживающие клетки, клетки спирального ганглия улитки, волосковые клетки вестибулярного матрикса, мешочка и ампулярного гребешка, а также клетки улитки и вестибулярные поддерживающие/вспомогательные клетки у новорожденных и взрослых мышей предполагают, например, что AAV Anc80 может способствовать развитию подходов генной терапии для заболеваний внутреннего уха.

**[0272] Иллюстративная последовательность капсидной ДНК Anc80 AAV (SEQ ID NO: 62)**

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT  
 CGCGAGTGGTGGGACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA  
 GCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAA  
 CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCAC  
 GACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAA  
 CCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCA  
 ACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGG  
 TTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAATCACCC  
 CAGGAACCAGACTCCTCTTCGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAGAA  
 GAGACTCAACTTTGGGCAGACAGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCCTCAACCAC  
 TCGGAGAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCAGCAGGC  
 GGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAACGCCTC  
 AGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACACCAGCA  
 CCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGCC  
 AATCGGGAGCAAGCACCACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGG  
 TATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACACGTGACTGGCAGCGACTC  
 ATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC  
 CAGGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCACCACGACCATCGCCAATAACSTTAC  
 CAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTCTCTCGGCTC  
 TGCGCACCCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCCTCAGTA

CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCTCCTTCTACTG  
 CCTGGAGTACTTTCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTCAGCTA  
 CACGTTTGAGGACGTGCCTTTTCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACC  
 GGCTGATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCA  
 CGAGTGGTACCGCAGGAAATCGGACGTTGCAATTTTCTCAGGCCGGGCCTAGTAGC  
 ATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGT  
 CTCCAAGACAGCGAATCAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCA  
 AGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTCCCGCTATGGCAACCC  
 ACAAGGACGACGAAGACAAATTTTTTCCGATGAGCGGAGTCTTAATATTTGGGAAA  
 CAGGGAGCTGGAAATAGCAACGTGGACCTTGACAACGTTATGATAACCAGTGAGGA  
 AGAAATTAACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCACGGTGGCCACTA  
 ACCTGCAATCGTCAAACACCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAAGGAGCC  
 TTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCTATCTGGGCC  
 AAGATTCCTCACACGGACGGACACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGA  
 CTGAAACACCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAGAATACACCTGTTCCCGCGAATCCT  
 CCAACTACCTTCAGTCCAGCTAAGTTTTCGTCGTTTCATCACGCAGTACAGCACCGGA  
 CAGGTCAGCGTGGAATGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGA  
 ACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACACTACAACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTG  
 TTGACACAAATGGCGTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCC  
 GTAATCTG

**[0273] Иллюстративная аминокислотная последовательность капсида Anc80L65  
 AAV (SEQ ID NO: 63)**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPF  
 NGLDKGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGG  
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPAKKRL  
 NFGQTGDSESVDPDPQPLGEPAAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNW  
 HCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPWGYFDFNR  
 FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTIANNLTSTVQVFTD  
 SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR  
 TGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQ  
 AGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNG  
 PAMATHKDDKDFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITSEEEIKTTNPVATEQYGT  
 VATNLQSSNTAPATGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMG  
 GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP  
 EIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL\*

**[0274] Иллюстративная аминокислотная последовательность остова Anc80 AAV (SEQ ID NO: XX)**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPF  
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGG  
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQPAX<sub>1</sub>KR  
 LNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAAAPSGVGSNTMX<sub>2</sub>AGGGAPMADNNEGADGVGNASGN  
 WHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHL YKQISSQSGX<sub>3</sub>STNDNTYFGYSTPWGYFDF  
 NRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKX<sub>4</sub>LNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVF  
 TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQM  
 LRTGNNF<sub>3</sub>FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRX<sub>6</sub>L  
 QFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTX<sub>7</sub>NQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL  
 VNPGPAMATHKDDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDDLDMITX<sub>8</sub>EEEIKTTNPVATE  
 X<sub>9</sub>YGTVATNLQSX<sub>10</sub>NTAPATGTVNSQ GALPGMVWQX<sub>11</sub>RDVYLQGPIWAKIPHTDGHF  
 HPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE  
 NSKRWNPEIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Эталон	Аминокислота
X <sub>1</sub>	К или R
X <sub>2</sub>	А или S
X <sub>3</sub>	А или G
X <sub>4</sub>	R или k
X <sub>5</sub>	Е или Q
X <sub>6</sub>	Т или Е
X <sub>7</sub>	А или Т
X <sub>8</sub>	S или N
X <sub>9</sub>	Q или Е
X <sub>10</sub>	S или А
X <sub>11</sub>	N или D

**Композиции**

**[0275]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит описанную в данном документе конструкцию. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или более конструкций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество описанных в данном документе

конструкций. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции, каждая конструкция имеет отличие.

**[0276]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит частицу AAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или более частиц AAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество частиц AAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной частицы AAV, все частицы AAV отличаются друг от друга.

**[0277]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит белок кларин 1. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит клетку.

**[0278]** В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой или содержит фармацевтическую композицию.

#### Композиции одиночной конструкции AAV

**[0279]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены 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 CLRN1. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию гAAV или содержит ее. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, одиночная конструкция гAAV способна экспрессировать полноразмерную матричную РНК CLRN1 или ее характерный белок в клетке-мишени (например, клетке внутреннего уха, например, клетке глаза). В некоторых вариантах осуществления одиночная конструкция (например, любая из конструкций, описанных в данном документе) может включать последовательность, кодирующую функциональный белок кларин 1 (например, любую конструкцию, которая генерирует функциональный белок кларин 1). В некоторых вариантах осуществления одиночная конструкция (например, любая из конструкций, описанных в данном документе) может включать последовательность, кодирующую функциональный белок кларин 1 (например, любую конструкцию, которая генерирует функциональный белок кларин 1) и необязательно дополнительные полипептидные последовательности (например, регуляторные последовательности и/или репортерные последовательности).

**[0280]** В некоторых вариантах осуществления композиция или система одиночной конструкции могут содержать любой или все иллюстративные компоненты конструкции,

описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной SEQ ID NO: 64. Специалисту в данной области известно, что конструкции могут подвергаться дополнительным модификациям, включая оптимизацию по кодонам, внесение новых, но функционально эквивалентных (например, молчащих мутаций), добавление репортерных последовательностей и/или другие стандартные модификации.

**[0281]** В некоторых вариантах осуществления композиция или система одиночной конструкции могут содержать любой или все иллюстративные компоненты конструкции, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной SEQ ID NO: 68. Специалисту в данной области известно, что конструкции могут подвергаться дополнительным модификациям, включая оптимизацию по кодонам, внесение новых, но функционально эквивалентных (например, молчащих мутаций), добавление репортерных последовательностей и/или другие стандартные модификации.

**[0282]** В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 21, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 46, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 38, промотор CBA, пример которого представлен в SEQ ID NO: 23, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 39, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 54, необязательно 5' UTR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 40, кодирующую CLRN1 область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 1, необязательно 3' UTR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 41, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 44, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 49, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 22 (см. ниже **таблицу 1**).

**Таблица 1. Иллюстративные конструкция и компоненты**

Компоненты (Порядок от 5' до 3')	Размер (нт)	Происхождение и примечания	Положение в иллюстративной последовательности одиночной конструкции (SEQ ID NO: 64)	SEQ ID NO.
5' ITR	145	AAV2 ITR дикого типа (AF043303.1)	1-145	21
Сайт клонирования	22	N/A (SalI/NotI/MluI)	146-167	46
Энхансер CMV	381	NCBI K03104.1 (140...520)	168-548	38
Промотор СВА	279	NCBI X00182.1 (268...543)	549-827	23
Химерный интрон	1013	NCBI X00182.1 (544...1503) NCBI V00882.1 (1250...1317); сайт клонирования XbaI	828-1840	39
Сайт клонирования	33	N/A; AgeI	1841-1873	54
5' UTR	291	NCBI NG_009168.1 (5001-5291)	1874-2164	40
CLRN1	696	NCBI NM_174878.3 (20-715)	2171-2866	1
3' UTR	1369	NCBI NG_009168.1 (50065-51433)	2876-4244	41
bGHpA	225	NCBI M57764.1 (2326-2550)	4245-4469	44
Сайт клонирования	39	N/A; HindIII/EcoRI/PvuII/R srII/AvrII	4470-4508	49
3' ITR	145	AAV2 ITR дикого типа (AF043303.1)	4509-4653	22

**[0283]** В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит:

5'-ITR, представленный SEQ ID NO: 21, необязательно сайт клонирования, представленный SEQ ID NO: 46, энхансер CMV, представленный SEQ ID NO: 38, промотор СВА, представленный SEQ ID NO: 23, химерный интрон, представленный SEQ ID NO: 39, необязательно сайт клонирования, представленный SEQ ID NO: 54, необязательно 5'-UTR, представленный SEQ ID NO: 40, кодирующую область CLRN1, представленную SEQ ID NO: 19, необязательно 3'-UTR, представленный SEQ ID NO: 41, сайт поли(A), представленный SEQ ID NO: 44, необязательно сайт клонирования, представленный SEQ ID NO: 49, и 3'-ITR, представленный SEQ ID NO: 22 (см. ниже таблицу 2).

**Таблица 2. Иллюстративные конструкция и компоненты**

<b>Компоненты (Порядок от 5' до 3')</b>	<b>Размер (нт)</b>	<b>Происхождение и примечания</b>	<b>Положение в иллюстративной последовательности одиночной конструкции (SEQ ID NO: 68)</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
5' ITR	145	AAV2 ITR дикого типа (AF043303.1)	1-145	21
Сайт клонирования	22	N/A (SalI/NotI/MluI)	146-167	46
Энхансер CMV	381	NCBI K03104.1 (140...520)	168-548	38
Промотор СВА	279	NCBI X00182.1 (268...543)	549-827	23
Химерный интрон	1013	NCBI X00182.1 (544...1503) NCBI V00882.1 (1250...1317); сайт клонирования XbaI	828-1840	39
Сайт клонирования	33	N/A; AgeI	1841-1873	54
5' UTR	291	NCBI NG_009168.1	1874-2164	40

Компонент ы (Порядок от 5' до 3')	Размер (нт)	Происхождение и примечания	Положение в иллюстративной последовательности одиночной конструкции (SEQ ID NO: 68)	SEQ ID NO.
		(5001-5291)		
CLRN1	696	NCBI NM_174878.3 (20-715)	2171-2866	19
3' UTR	1369	NCBI NG_009168.1 (50065-51433)	2876-4244	41
bGHpA	225	NCBI M57764.1 (2326-2550)	4245-4469	44
Сайт клонировани я	39	N/A; HindIII/EcoRI/PvuII /RsrII/AvrII	4470-4508	49
3' ITR	145	AAV2 ITR дикого типа (AF043303.1)	4509-4653	22

**[0284] Иллюстративная последовательность 1 одиночной конструкции (SEQ ID NO: 64)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC  
GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA  
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTTCGACGCGGCCGCACGCGTGAC  
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC  
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC  
CCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA  
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG  
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA  
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC  
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTT  
TGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTT  
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG  
GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG

CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGG  
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC  
CCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT  
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT  
GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCG  
GGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC  
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGC  
GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGT  
GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC  
GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCTGC  
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG  
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCC  
GGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGG  
CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGGCAGCCGAGCCATTGCCTTTTATG  
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGA  
AATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGC  
GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCTCC  
CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG  
ACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG  
CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT  
TGTGACCGGTAGGAGATACTTGAAGGCAGTTTGAAAGACTTGTTTTACAGATTCTTA  
GTCCAAAGATTTCCAATTAGGGAGAAGAAGCAGCAGAAAAGGAGAAAAGCCAAGT  
ATGAGTGATGATGAGGCCTTCATCTACTGACATTTAACCTGGCGAGAACCGTCGATG  
GTGAAGTTGCCTTTTCAGCTGGGAGCTGTCCGTTTCAGCTTCGTAATAAATGCAGTC  
AAAGAGGCAGTCCCTTCCCATTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTTGAACCTCGCCCTCA  
CAGAAGCCGTTTCTCATCGCCACCATGCCAAGCCAACAGAAGAAAATCATTTTTTGC  
ATGGCCGGAGTGTTTCAGTTTTGTCATGTGCCCTCGGAGTTGTGACAGCCTTGGGGACA  
CCGTTGTGGATCAAAGCCACTGTCCTCTGCAAACGGGAGCTCTGCTCGTCAATGCC  
TCAGGGCAGGAGCTGGACAAGTTTATGGGTGAAATGCAGTACGGGCTTTTCCACGG  
AGAGGGTGTGAGGCAGTGTGGGTTGGGAGCAAGGCCCTTTCGGTTCTCATTTTTTCC  
AGATTTGCTCAAAGCAATCCCAGTGAGCATCCACGTCAATGTCATTCTCTCTCTGC  
CATCCTTATTGTGTTAACCATGGTGGGGACAGCCTTCTTCATGTACAATGCTTTTGA  
AAACCTTTTGAAACTCTGCATGGTCCCCTAGGGCTGTACCTTTTGAGCTTCATTTAG  
GCTCCTGTGGCTGTCTTGTCATGATATTGTTTGCCTCTGAAGTGAAAATCCATCACCT  
CTCAGAAAAAATTGCAAATTATAAAGAAGGGACTTATGTCTACAAAACGCAAAGTG

AAAATATACCACCTCATTCTGGGTCATTTTCTTTTGCTTTTTTGTTCATTTTCTGAAT  
GGGCTCCTAATACGACTTGCTGGATTCAGTTCCTTTTGCAAATCTAAAGACGCA  
GAAACAATAATGTAGCTGCAGATCTAATGTACTAAGAGCTCAAGGCAAACCTTTCT  
ATAATTTTACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTTAGATGTGGTTAATTTTGCA  
TATCCTTTTAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCCTTCGTGACAATGTTTACAA  
ATTACGTACTAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAGCAGAAGGAAGGCTTTGA  
AAAGTTGTTTTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGTAGTCAAAGGCAGTTGACT  
AGAATCGACAAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GTGTAAGATGTCTTCCATCAAAAAGATATCAAAGGCACATGGAATATATTTTAATA  
AAAACAATAATATCTCTAATATATCCACACATTTGTTGCCAGATTCAGAAAACCTG  
AGCTGCAATCGCTTTCCATAAACAGTAGTGTATTAATGAACATCTATAAAATGTAT  
CAACACACATTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCTTAGGCCAGGCGTGGTGACT  
CACACCTGTAATTCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTGGGAAGATCATTTGAGTTCA  
GGAGTTCGAGTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACCCTGTCACTAACAAAATTA  
AAAATAAAATAAATATAAAATATAGGCTTTAAAAAAGCATAGTCTTATTAACCATG  
TCTGTTGGTCAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAAGAAGAAAAACCAACGTT  
AGGGTATTTTCCCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATTCACGACAGTACTTTCAATG  
AACATAATTGTTAGGACCACTGAGGAATCATGAAAAATGATCTCTGCTTAGTACATT  
TGATGCAAATGACTTATTAGGGGCTGTTTTTCTAGCTATAGTGTCTCGAGTACTAA  
TATGCAATTATGAAAATTATATTAATCTGGGATTATGACGGTATCACTGTATCATC  
TTGGTCTTGTTCTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGTCAACTTTTTTTTTCCCTGA  
ATTACCCATCAAATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCACAGCTGAGCCTGGAACCTG  
ACCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCCTCCAGAAAGCACCAAGGAAAAAGCAGAG  
AATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAGGTGCTGAGTACTCAGCAGC  
CCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAAACACTGTTTCCCTTTGGAA  
CTATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAATAACTTGCTCTGGTGTCAAT  
TCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTTTCCAGATGCTCTGTGCCTTC  
TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT  
GCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT  
AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG  
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTC  
AGCTGACGTGCCTCGGACCGTCCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT  
CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCG  
GCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC  
CAA

**[0285] Иллюстративная последовательность 2 одиночной конструкции (SEQ ID NO: 68)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC  
GCCCCGACCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA  
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTGACGCGGCCGCACGCGTGAC  
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC  
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC  
CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA  
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG  
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA  
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC  
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTT  
TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTT  
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG  
GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG  
CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG  
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC  
CCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT  
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT  
GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCG  
GGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC  
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGC  
GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGT  
GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC  
GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCTGC  
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG  
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCC  
GGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGC  
CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG  
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGA  
AATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGC  
GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCTCC  
CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG  
ACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG  
CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT

TGTGACCGGTAGGAGATACTTGAAGGCAGTTTGAAAGACTTGTTTTACAGATTCTTA  
GTCCAAAGATTTCCAATTAGGGAGAAGAAGCAGCAGAAAAGGAGAAAAGCCAAGT  
ATGAGTGATGATGAGGCCTTCATCTACTGACATTTAACCTGGCGAGAACCGTTCGATG  
GTGAAGTTGCCTTTTCAGCTGGGAGCTGTCCGTTTCAGCTTCCGTAATAAATGCAGTC  
AAAGAGGCAGTCCCTTCCCATTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTTGAACCTCGCCCTCA  
CAGAAGCCGTTTCTCATCGCCACCATGCCTAGCCAGCAGAAGAAAATCATCTTCTGC  
ATGGCCGGCGTGTTTCAGCTTCGCCTGTGCTCTGGGAGTTGTGACAGCCCTGGGAACC  
CCTCTGTGGATCAAAGCCACAGTGCTGTGCAAGACAGGCGCCCTGCTGGTTAATGCC  
TCTGGCCAAGAGCTGGACAAGTTCATGGGCGAGATGCAGTACGGCCTGTTCCATGG  
CGAAGGCGTCAGACAGTGTGGCCTGGGAGCCAGACCTTTCAGATTCAGCTTCTTCCC  
AGACCTGCTGAAGGCTATCCCCGTGTCATCCACGTGAACGTGATCCTGTTTCAGCGC  
CATCCTGATCGTGCTGACAATGGTTCGGAACCGCCTTCTTCATGTACAACGCCTTCGG  
CAAGCCCTTCGAGACACTGCATGGACCTCTGGGCCTGTACCTGCTGAGCTTTATCAG  
CGGCAGCTGTGGCTGCCTGGTCATGATTCTGTTCGCCAGCGAAGTGAAGATCCACCA  
CCTGAGCGAGAAGATCGCCAATAAAGAGGGCACCTACGTCTACAAGACCCAGT  
CCGAGAAGTACACCACCAGCTTTTGGGTTATCTTCTTCTGTTTTCTTCGTGCACTTCT  
GAACGGCCTGCTGATCAGACTGGCCGGCTTCCAGTTTCCATTTCGCCAAGAGCAAGG  
ACGCCGAAACCACAAACGTGGCCGCGATCTGATGTACTAAGAGCTCAAGGCAAAC  
CTTTCTATAATTTTACAAGGGAGTAGACTTGCTTTGGTCACTTTTAGATGTGGTTAAT  
TTTGCATATCCTTTTAGTCTGCATATATTAAGCATCAGGACCCTTCGTGACAATGTT  
TACAAATTACGTACTAAGGATACAGGCTGGAAAGTAAGGGAAGCAGAAGGAAGGC  
TTTGAAAAGTTGTTTTATCTGGTGGGAAATTGCTTGACCCAGGTAGTCAAAGGCAGT  
TGACTAGAATCGACAAATTGTTACTCCATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGT  
GTGTGTGTGTAAGATGTCTTCTATCAAAAAGATATCAAAGGCACATGGAATATATT  
TTAATAAAAACAAATAATATCTCTAATATATCCACACATTTGTTGCCAGATTTCAGA  
AAACTGAGCTGCAATCGCTTTCCTAAAACAGTAGTGTATTAAATGAACATCTATAAA  
ATGTATCAACACACATTTTAAAAAATTTGTTTAAAGTATACTCTTAGGCCAGGCGTG  
GTGACTCACACCTGTAATTCAGCACTTCAGGAGGCCAAGGTGGGAAGATCATTG  
AGTTCAGGAGTTCGAGTTACAGCCTGGGCAATAAAGTGAGACCCTGTCACTAACAA  
AATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
ACCATGTCTGTTGGTCAAATCTGCAAACCTCTAAAAGAAGAAAAGAAGAAAAAACC  
AACGTTAGGGTATTTTTCTCCCGTGCCTGAGTCCCAATTACATTCACGACAGTACTT  
TCAATGAACATAATTGTTAGGACCACTGAGGAATCATGAAAAATGATCTCTGCTTAG  
TACATTTGATGCAAAATGACTTATTAGGGGCTGTTTTTCTAGCTATAGTGTCTCGAGT  
ACTAATATGCAATTATGAAAATTATATTAATCTGGGATTATGACGGTATCACTGTA

TCATCTTGGTCTTGTCTGGCTGTCACCAAGCATGACCCAGGTCAACTTTTTTTTCC  
 CCTGAATTACCCATCAAATTGATCTGCAGCTGACTAAAGGCCACAGCTGAGCCTGGA  
 ACTGACCCTTCCTTCATCCTCAACCTGCTGTCCTCCAGAAAGCACCAAGGAAAAAGC  
 AGAGAATGACAGCAAACAGATCACTAGGCCTCTGACCACAGGTGCTGAGTACTCAG  
 CAGCCCTCATATAATAGGTTTGAAAGTACTCCTTAAAATAAAACACTGTTTCCCTTT  
 GGAACSTATTTACAAGGATGAAACAACCGTATACCTGAGAAATAACTTGCTCTGGTGT  
 CAATTCGCTATTCGCCAGCAGACATCAGAACACACCGAGTTTCCAGATGCTCTGTGC  
 CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA  
 AGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCSTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT  
 GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG  
 ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGA  
 ATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGTCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC  
 ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGT  
 CGGGCGACSTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT  
 GGCCAA

Композиции множественных конструкций ААV

[0286] В настоящем раскрытии подразумевается, что некоторые кодирующие последовательности, кодирующие белок (например, белок кларин 1), могут быть доставлены путем разделения кодирующей последовательности на несколько частей, каждая из которых включена в отдельную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены композиции или системы, включающие по меньшей мере две различные конструкции (например, две, три, четыре, пять или шесть). В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух различных конструкций включает кодирующую последовательность, которая кодирует различную часть кодирующей области (например, кодирующую белок-мишень, например, белок-мишень внутреннего уха, например, белок-мишень глаза, например, например, белок кларин 1), каждая из кодируемых частей содержит по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60 аминокислот, по меньшей мере около 70 аминокислот, по меньшей мере около 80 аминокислот, по меньшей мере около 90 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 110 аминокислот, по меньшей мере около 120 аминокислот, по меньшей мере около 130 аминокислот, по меньшей мере около 140 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 160



другой одной из кодируемых частей; ни одна конструкция из по меньшей мере двух различных конструкций не кодирует активный белок-мишень; и при введении в клетку субъекта (например, клетку животного, например, клетку примата, например, клетку человека), по меньшей мере две различные конструкции подвергаются гомологичной рекомбинации друг с другом, при этом рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок-мишень (например, генный продукт, кодируемый геном CLRN1 или его характерной частью). В некоторых вариантах осуществления одна из конструкций нуклеиновой кислоты может включать кодирующую последовательность, которая кодирует часть белка-мишени (например, белок-мишень внутреннего уха, например, белок кларин 1), причем кодируемая часть содержит не более 820 аминокислот (например, не более около 10 аминокислот, не более около 20 аминокислот, не более около 30 аминокислот, не более около 60 аминокислот, не более около 70 аминокислот, не более около 80 аминокислот, не более около 90 аминокислот, не более около 100 аминокислот, не более около 110 аминокислот, не более около 120 аминокислот, не более около 130 аминокислот, не более около 140 аминокислот, не более около 150 аминокислот, не более около 160 аминокислот, не более около 170 аминокислот, не более около 180 аминокислот, не более около 190 аминокислот, не более около 200 аминокислот, не более около 210 аминокислот, не более около 220 аминокислот, не более около 230 аминокислот, не более около 240 аминокислот, не более около 250 аминокислот, не более около 260 аминокислот, не более около 270 аминокислот, не более около 280 аминокислот, не более около 290 аминокислот, не более около 300 аминокислот, не более около 310 аминокислот, не более около 320 аминокислот, не более около 330 аминокислот, не более около 340 аминокислот, не более около 350 аминокислот, не более около 360 аминокислот, не более около 370 аминокислот, не более около 380 аминокислот, не более около 390 аминокислот, не более около 400 аминокислот, не более около 410 аминокислот, не более около 420 аминокислот, не более около 430 аминокислот, не более около 440 аминокислот, не более около 450 аминокислот, не более около 460 аминокислот, не более около 470 аминокислот, не более около 480 аминокислот, не более около 490 аминокислот, не более около 500 аминокислот, не более около 510 аминокислот, не более около 520 аминокислот, не более около 530 аминокислот, не более около 540 аминокислот, не более около 550 аминокислот, не более около 560 аминокислот, не более около 570 аминокислот, не более около 580 аминокислот, не более около 590 аминокислот, не более около 600 аминокислот, не более около 610 аминокислот, не более около 620 аминокислот, не более около 630 аминокислот, не более около 640 аминокислот, не более около 650 аминокислот, не более около 660 аминокислот, не более около 670 аминокислот, не более около 680 аминокислот, не более около 690

аминокислот, не более около 700 аминокислот, не более около 710 аминокислот, не более около 720 аминокислот, не более около 730 аминокислот, не более около 740 аминокислот, не более около 750 аминокислот, не более около 760 аминокислот, не более около 770 аминокислот, не более около 780 аминокислот, не более около 790 аминокислот, не более около 800 аминокислот, не более около 810 аминокислот или не более около 820 аминокислот).

**[0287]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из конструкций включает нуклеотидную последовательность, охватывающую два соседних экзона геномной ДНК-мишени (например, геномную ДНК-мишень внутреннего уха, например, геномную ДНК CLRN1), и не содержит интронной последовательности, которая в природе встречается между двумя соседними экзонами.

**[0288]** В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части каждой из конструкций не перекрывается, даже частично, с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью кодируемой части другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части каждой конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью кодируемой части по меньшей мере одной другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от около 10 аминокислотных остатков до около 300 аминокислот, или в любом из поддиапазонов этого диапазона (например, около 10 аминокислот, около 20 аминокислот, около 30 аминокислот, около 60 аминокислот, около 70 аминокислот, около 80 аминокислот, около 90 аминокислот, около 100 аминокислот, около 110 аминокислот, около 120 аминокислот, около 130 аминокислот, около 140 аминокислот, около 150 аминокислот, около 160 аминокислот, около 170 аминокислот, около 180 аминокислот, около 190 аминокислот, около 200 аминокислот, около 210 аминокислот, около 220 аминокислот, около 230 аминокислот, около 240 аминокислот, около 250 аминокислот, около 260 аминокислот, около 270 аминокислот, около 280 аминокислот, около 290 аминокислот, около 300 аминокислот, около 310 аминокислот, около 320 аминокислот, около 330 аминокислот, около 340 аминокислот, около 350 аминокислот, около 360 аминокислот, около 370 аминокислот, около 380 аминокислот, около 390 аминокислот, около 400 аминокислот, около 410 аминокислот, около 420 аминокислот, около 430 аминокислот, около 440 аминокислот, около 450 аминокислот, около 460 аминокислот, около 470 аминокислот, около 480 аминокислот, около 490

аминокислот, около 500 аминокислот, около 510 аминокислот, около 520 аминокислот, около 530 аминокислот, около 540 аминокислот, около 550 аминокислот, около 560 аминокислот, около 570 аминокислот, около 580 аминокислот, около 590 аминокислот, около 600 аминокислот, около 610 аминокислот, около 620 аминокислот, около 630 аминокислот, около 640 аминокислот, около 650 аминокислот, около 660 аминокислот, около 670 аминокислот, около 680 аминокислот, около 690 аминокислот, около 700 аминокислот, около 710 аминокислот, около 720 аминокислот, около 730 аминокислот, около 740 аминокислот, около 750 аминокислот, около 760 аминокислот, около 770 аминокислот, около 780 аминокислот, около 790 аминокислот, около 800 аминокислот, около 810 аминокислот или около 820 аминокислот).

**[0289]** В некоторых примерах желаемый генный продукт (например, терапевтический генный продукт) кодируется по меньшей мере двумя разными конструкциями. В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух различных конструкций включает другой сегмент интрона, причем интрон включает нуклеотидную последовательность интрона, которая присутствует в геномной ДНК-мишени (например, в геномной ДНК-мишени клетки внутреннего уха или геномной ДНК-мишени клетки глаза (например, геномной ДНК CLRN1) (например, любой из иллюстративных интронов в SEQ ID NO: 5, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления различные сегменты интрона перекрываются. В некоторых вариантах осуществления различные сегменты интрона перекрываются по последовательности не более чем на 12 000 нуклеотидов (например, не более чем на около 100 нуклеотидов, не более чем на около 200 нуклеотидов, не более чем на около 300 нуклеотидов, не более чем на около 600 нуклеотидов, не более чем на около 700 нуклеотидов, не более чем на около 800 нуклеотидов, не более чем на около 900 нуклеотидов, не более чем на около 1000 нуклеотидов, не более чем на около 1100 нуклеотидов, не более чем на около 1200 нуклеотидов, не более чем на около 1300 нуклеотидов, не более чем на около 1400 нуклеотидов, не более чем на около 1500 нуклеотидов, не более чем на около 1600 нуклеотидов, не более чем на около 1700 нуклеотидов, не более чем на около 1800 нуклеотидов, не более чем на около 1900 нуклеотидов, не более чем на около 2000 нуклеотидов, не более чем на около 2100 нуклеотидов, не более чем на около 2200 нуклеотидов, не более чем на около 2300 нуклеотидов, не более чем на около 2400 нуклеотидов, не более чем на около 2500 нуклеотидов, не более чем на около 2600 нуклеотидов, не более чем на около 2700 нуклеотидов, не более чем на около 2800 нуклеотидов, не более чем на около 2900 нуклеотидов, не более чем на около 3000 нуклеотидов, не более чем на около 3100 нуклеотидов, не более чем на около 3200



нуклеотидов, не более чем на около 10 300 нуклеотидов, не более чем на около 10 400 нуклеотидов, не более чем на около 10 500 нуклеотидов, не более чем на около 10 600 нуклеотидов, не более чем на около 10 700 нуклеотидов, не более чем на около 10 800 нуклеотидов, не более чем на около 10 900 нуклеотидов, не более чем на около 11 000 нуклеотидов, не более чем на около 11 100 нуклеотидов, не более чем на около 11 200 нуклеотидов, не более чем на около 11 300 нуклеотидов, не более чем на около 11 400 нуклеотидов, не более чем на около 11 500 нуклеотидов, не более чем на около 11 600 нуклеотидов, не более чем на около 11 700 нуклеотидов, не более чем на около 11 800 нуклеотидов, не более чем на около 11 900 нуклеотидов или не более чем на около 12 000 нуклеотидов) в длину. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся нуклеотидная последовательность в любых двух различных конструкциях может включать часть или все из одного или более экзонов гена-мишени (например, гена-мишени клетки внутреннего уха или гена-мишени клетки глаза (например, гена CLRN1) (например, любого одного или более иллюстративных экзонов в SEQ ID NO: 5, описанных в данном документе).

**[0290]** В некоторых вариантах осуществления композиция или система представляет собой или содержит две, три, четыре или пять различных конструкций. В композициях, в которых количество различных конструкций равно двум, первая из двух различных конструкций может включать кодирующую последовательность, кодирующую N-концевую часть белка (например, белок кларин 1), которая может обозначаться как ведущая часть, первая конструкция или 5'-часть (например, N-концевая часть белка клетки внутреннего уха, например, N-концевая часть белка клетки глаза, например, N-концевая часть белка кларина 1). В некоторых примерах N-концевая часть гена-мишени имеет длину по меньшей мере около 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60 аминокислот, по меньшей мере около 70 аминокислот, по меньшей мере около 80 аминокислот, по меньшей мере около 90 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 110 аминокислот, по меньшей мере около 120 аминокислот, по меньшей мере около 130 аминокислот, по меньшей мере около 140 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 160 аминокислот, по меньшей мере около 170 аминокислот, по меньшей мере около 180 аминокислот, по меньшей мере около 190 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 210 аминокислот, по меньшей мере около 220 аминокислот, по меньшей мере около 230 аминокислот, по меньшей мере около 240 аминокислот, по меньшей мере около 250

аминокислот, по меньшей мере около 260 аминокислот, по меньшей мере около 270  
аминокислот, по меньшей мере около 280 аминокислот, по меньшей мере около 290  
аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 310  
аминокислот, по меньшей мере около 320 аминокислот, по меньшей мере около 330  
аминокислот, по меньшей мере около 340 аминокислот, по меньшей мере около 350  
аминокислот, по меньшей мере около 360 аминокислот, по меньшей мере около 370  
аминокислот, по меньшей мере около 380 аминокислот, по меньшей мере около 390  
аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 410  
аминокислот, по меньшей мере около 420 аминокислот, по меньшей мере около 430  
аминокислот, по меньшей мере около 440 аминокислот, по меньшей мере около 450  
аминокислот, по меньшей мере около 460 аминокислот, по меньшей мере около 470  
аминокислот, по меньшей мере около 480 аминокислот, по меньшей мере около 490  
аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 510  
аминокислот, по меньшей мере около 520 аминокислот, по меньшей мере около 530  
аминокислот, по меньшей мере около 540 аминокислот, по меньшей мере около 550  
аминокислот, по меньшей мере около 560 аминокислот, по меньшей мере около 570  
аминокислот, по меньшей мере около 580 аминокислот, по меньшей мере около 590  
аминокислот, по меньшей мере около 600 аминокислот, по меньшей мере около 610  
аминокислот, по меньшей мере около 620 аминокислот, по меньшей мере около 630  
аминокислот, по меньшей мере около 640 аминокислот, по меньшей мере около 650  
аминокислот, по меньшей мере около 660 аминокислот, по меньшей мере около 670  
аминокислот, по меньшей мере около 680 аминокислот, по меньшей мере около 690  
аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 710  
аминокислот, по меньшей мере около 720 аминокислот, по меньшей мере около 730  
аминокислот, по меньшей мере около 740 аминокислот, по меньшей мере около 750  
аминокислот, по меньшей мере около 760 аминокислот, по меньшей мере около 770  
аминокислот, по меньшей мере около 780 аминокислот, по меньшей мере около 790  
аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 810  
аминокислот или по меньшей мере около 820 аминокислот). В некоторых примерах первая  
конструкция дополнительно содержит промотор (например, любой из промоторов,  
описанных в данном документе или известных в данной области техники) и/или  
последовательность Козак (например, любую из иллюстративных последовательностей  
Козак, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В  
некоторых примерах первая конструкция содержит промотор, который является  
индуцибельным промотором, конститутивным промотором или тканеспецифичным

промотором. В некоторых примерах вторая из двух разных конструкций включает кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка, которая может называться концевой частью, второй конструкцией или 3'-частью (например, С-концевая часть белка-мишени клетки внутреннего уха, например, С-концевая часть белка-мишени клетки глаза, например, С-концевая часть белка кларина 1). В некоторых примерах С-концевая часть белка-мишени имеет длину по меньшей мере около 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60 аминокислот, по меньшей мере около 70 аминокислот, по меньшей мере около 80 аминокислот, по меньшей мере около 90 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 110 аминокислот, по меньшей мере около 120 аминокислот, по меньшей мере около 130 аминокислот, по меньшей мере около 140 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 160 аминокислот, по меньшей мере около 170 аминокислот, по меньшей мере около 180 аминокислот, по меньшей мере около 190 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 210 аминокислот, по меньшей мере около 220 аминокислот, по меньшей мере около 230 аминокислот, по меньшей мере около 240 аминокислот, по меньшей мере около 250 аминокислот, по меньшей мере около 260 аминокислот, по меньшей мере около 270 аминокислот, по меньшей мере около 280 аминокислот, по меньшей мере около 290 аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 310 аминокислот, по меньшей мере около 320 аминокислот, по меньшей мере около 330 аминокислот, по меньшей мере около 340 аминокислот, по меньшей мере около 350 аминокислот, по меньшей мере около 360 аминокислот, по меньшей мере около 370 аминокислот, по меньшей мере около 380 аминокислот, по меньшей мере около 390 аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 410 аминокислот, по меньшей мере около 420 аминокислот, по меньшей мере около 430 аминокислот, по меньшей мере около 440 аминокислот, по меньшей мере около 450 аминокислот, по меньшей мере около 460 аминокислот, по меньшей мере около 470 аминокислот, по меньшей мере около 480 аминокислот, по меньшей мере около 490 аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 510 аминокислот, по меньшей мере около 520 аминокислот, по меньшей мере около 530 аминокислот, по меньшей мере около 540 аминокислот, по меньшей мере около 550 аминокислот, по меньшей мере около 560 аминокислот, по меньшей мере около 570 аминокислот, по меньшей мере около 580 аминокислот, по меньшей мере около 590 аминокислот, по меньшей мере около 600

аминокислот, по меньшей мере около 610 аминокислот, по меньшей мере около 620 аминокислот, по меньшей мере около 630 аминокислот, по меньшей мере около 640 аминокислот, по меньшей мере около 650 аминокислот, по меньшей мере около 660 аминокислот, по меньшей мере около 670 аминокислот, по меньшей мере около 680 аминокислот, по меньшей мере около 690 аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 710 аминокислот, по меньшей мере около 720 аминокислот, по меньшей мере около 730 аминокислот, по меньшей мере около 740 аминокислот, по меньшей мере около 750 аминокислот, по меньшей мере около 760 аминокислот, по меньшей мере около 770 аминокислот, по меньшей мере около 780 аминокислот, по меньшей мере около 790 аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 810 аминокислот или по меньшей мере около 820 аминокислот). В некоторых примерах вторая конструкция дополнительно включает последовательность поли(А).

**[0291]** В некоторых примерах, когда количество различных конструкций в композиции равно двум, N-концевая часть, кодируемая одной из двух конструкций, может включать часть, включающую от аминокислотного положения 1 до приблизительно аминокислотного положения 820, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 70, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 90, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 100, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 110, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 120, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 130, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 140, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 150, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 160, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 170, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 180, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 190, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 200, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 210, от аминокислоты 1 до по меньшей мере



приблизительно аминокислоты 570, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 580, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 590, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 600, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 610, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 620, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 630, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 640, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 650, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 660, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 670, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 680, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 690, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 700, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 710, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 720, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 730, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 740, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 750, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 1 до по меньшей мере  
 приблизительно аминокислоты 820) белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-  
 мишени клеток глаза (например, SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 или 14). В некоторых примерах,  
 когда число различных конструкций в композиции равно двум, N-концевая часть  
 предшественника белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-мишени клеток глаза  
 может включать часть, включающую не более чем от аминокислотного положения 1 до  
 аминокислотного положения 820 или любой поддиапазон этого диапазона (например, от  
 аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до  
 не более чем приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до не более чем  
 приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно  
 аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 70,



аминокислоты 510, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 520, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 530, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 540, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 550, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 560, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 570, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 580, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 590, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 600, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 610, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 620, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 630, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 640, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 650, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 660, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 670, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 680, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 690, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 700, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 710, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 720, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 730, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 740, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 750, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 820) белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-мишени клеток глаза (например, SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 или 14)

**[0292]** В некоторых примерах, когда количество различных конструкций в композиции равно двум, С-концевая часть, кодируемая одной из двух конструкций, может включать часть, включающую от конечной аминокислоты (например, приблизительно аминокислотного положения 820) до приблизительно аминокислотного положения 1, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 820 до по меньшей мере





приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 820 до по меньшей мере  
приблизительно аминокислоты 820) белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-  
мишени клеток глаза (например, SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 или 14). В некоторых примерах,  
когда число различных конструкций в композиции равно двум, С-концевая часть  
предшественника белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-мишени клеток глаза  
может включать часть, включающую от конечной аминокислоты (например,  
приблизительно аминокислотное положение 820) до не более чем приблизительно  
аминокислотного положения 1, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от  
аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 820  
до не более чем приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 820 до не более чем  
приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно  
аминокислоты 60, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 70,  
от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты  
820 до не более чем приблизительно аминокислоты 90, от аминокислоты 820 до не более  
чем приблизительно аминокислоты 100, от аминокислоты 820 до не более чем  
приблизительно аминокислоты 110, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно  
аминокислоты 120, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты  
130, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 140, от  
аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 150, от аминокислоты  
820 до не более чем приблизительно аминокислоты 160, от аминокислоты 820 до не более  
чем приблизительно аминокислоты 170, от аминокислоты 820 до не более чем  
приблизительно аминокислоты 180, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно  
аминокислоты 190, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты  
200, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 210, от  
аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 220, от аминокислоты  
820 до не более чем приблизительно аминокислоты 230, от аминокислоты 820 до не более  
чем приблизительно аминокислоты 240, от аминокислоты 820 до не более чем  
приблизительно аминокислоты 250, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно  
аминокислоты 260, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты  
270, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 280, от



690, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 700, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 710, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 720, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 730, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 740, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 750, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 820) или последовательность любой длины между этими последовательностями белка-мишени клеток внутреннего уха или белка-мишени клеток глаза (например, SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 или 14).

**[0293]** В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга вовлечены в транс-сплайсинг. В некоторых вариантах осуществления сайт сплайс-донора (см., например, Trapani et al. EMBO Mol. Med. 6(2):194-211, 2014, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки) следует за кодирующей последовательностью в N-концевой конструкции. В С-концевой конструкции сайт сплайс-акцептора может быть субклонирован непосредственно перед кодирующей последовательностью гена CLRN1. В некоторых вариантах осуществления в кодирующую последовательность может быть внесена молчащая мутация, создающая дополнительный сайт для рестрикционного расщепления.

**[0294]** В некоторых вариантах осуществления любая из предложенных в данном документе конструкций может быть внесена в композицию, подходящую для введения животному для облегчения симптомов, связанных с синдромальной и/или несиндромальной потерей слуха.

**[0295]** В некоторых вариантах осуществления любая из предложенных в данном документе конструкций может быть внесена в композицию, подходящую для введения животному для облегчения симптомов, связанных с потерей зрения.

#### Фармацевтические композиции

**[0296]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции. В некоторых вариантах осуществления композиции, предложенные в данном документе, подходят для введения животному для облегчения симптомов, связанных с потерей зрения. В некоторых вариантах осуществления композиции, предложенные в

данном документе, подходят для введения животному для облегчения симптомов, связанных с синдромальной и/или несиндромальной потерей слуха.

**[0297]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать, например, полинуклеотид, например, одну или более конструкций, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать одну или более частиц AAV, например, одну или более конструкций gAAV, инкапсулированных одним или более капсидами серотипа AAV, как описано в данном документе.

**[0298]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные агенты, противогрибные агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в любую из композиций, описанных в данном документе. Такие композиции могут содержать один или более буферов, таких как физиологический раствор с нейтральным буфером, физиологический раствор с фосфатным буфером и т.п.; один или более углеводов, таких как глюкоза, манноза, сахароза и декстран; маннит; один или более белков, полипептидов или аминокислот, таких как глицин; один или более антиоксидантов; один или более хелатирующих агентов, таких как ЭДТА или глутатион; и/или один или более консервантов. В некоторых вариантах осуществления составы находятся в лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

**[0299]** В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала липидную наночастицу, полимерную наночастицу, миникольцевую ДНК и/или ДНК CELiD.

**[0300]** В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала раствор синтетической перилимфы. Например, в некоторых вариантах осуществления раствор синтетической перилимфы включает 20-200 mM NaCl; 1-5 mM KCl; 0,1-10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1-10 mM глюкозы; и 2-50 mM HEPES с pH от около 6 до около 9. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала физиологически подходящий раствор.

Например, в некоторых вариантах осуществления физиологически подходящий раствор содержит коммерчески доступный 1хФСБ с плурониловой кислотой F68, приготовленный до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия, 1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001% плурониловой кислоты F68). В некоторых вариантах осуществления применяются альтернативные плурониловые кислоты. В некоторых вариантах осуществления используются альтернативные концентрации ионов.

**[0301]** В некоторых вариантах осуществления любая из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, может дополнительно содержать один или более агентов, которые способствуют проникновению нуклеиновой кислоты или любой из конструкций, описанных в данном документе, в клетку млекопитающего (например, липосому или катионный липид). В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе конструкций может быть составлена с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из композиций, описанных в данном документе, могут включать, без ограничения, DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Пасадена, штат Калифорния), составы из Mirus Bio (Мэдисон, штат Висконсин) и Roche Madison (Мэдисон, штат Висконсин), полимерные составы PhaseRX, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Сиэтл, штат Вашингтон), DMRI/DOPE, полуксамер, адьювант VAXFECTIN® из Vical (Сан-Диего, штат Калифорния), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Пасадена, штат Калифорния), дендримеры и полимеры молочно-гликолевой кислоты (PLGA), полимеры RONDEL™ (РНКи/олигонуклеотидная доставка наночастиц) (Arrowhead Research Corporation, Пасадена, штат Калифорния) и pH-чувствительные сополимерные полимеры, такие как, без ограничения, полимеры, произведенные PhaseRX (Сиэтл, штат Вашингтон). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность в доставке олигонуклеотидов *in vivo* в клетку млекопитающего (см., например, deFougerolles, *Human Gene Ther.* 19:125-132, 2008; Rozema et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., *Cancer Res.* 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5715-5721, 2007, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

**[0302]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель (например, забуференный фосфатом физиологический раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). После составления раствора будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве,

которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

**[0303]** В некоторых вариантах осуществления композиция, предложенная в данном документе, может быть, например, составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например, внутрикочлеарное введение).

**[0304]** В некоторых вариантах осуществления способ доставки, как раскрыто в настоящем документе, включает синтетический капсид AAV (например, AAV Anc80) для трансдукции клеток внутреннего уха и/или устройство для направленной доставки непосредственно в улитку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции, подходящие для трансдукции клеток внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления трансдукция клеток внутреннего уха может обеспечить длительную экспрессию белка CLRN1 в улитке при минимальном системном воздействии.

**[0305]** В некоторых вариантах осуществления способ доставки, как раскрыто в настоящем документе, включает синтетический капсид AAV (например, AAV Anc80) для трансдукции клеток глаза и/или устройство для направленной доставки непосредственно в глаз. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции, подходящие для трансдукции клеток глаза. В некоторых вариантах осуществления трансдукция клеток глаза может обеспечить длительную экспрессию белка CLRN1 в глазу при минимальном системном воздействии.

**[0306]** В некоторых вариантах осуществления предложенная композиция содержит одну конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления предложенная композиция содержит две или более различных конструкции. В некоторых вариантах осуществления композиция включает одиночную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует белок кларин 1 и/или его функциональную характерную часть. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат одиночную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует белок кларин 1 и/или его функциональную характерную часть, при введении которой в клетку млекопитающего эта кодирующая последовательность интегрируется в геном клетки млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая по меньшей мере две различные конструкции, например, конструкции содержат кодирующие последовательности, которые кодируют другую часть белка кларина 1, конструкции можно

комбинировать для создания последовательности, кодирующей активный белок кларин 1 (например, полноразмерный белок кларин 1) в клетке млекопитающего и тем самым лечить ассоциированную синдромальную или несиндромальную нейросенсорную потерю слуха у нуждающегося в этом субъекта.

**[0307]** Также предложены наборы, содержащие любую из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать твердую композицию (например, лиофилизированную композицию, содержащую по меньшей мере две различные конструкции, описанные в данном документе) и жидкость для сольубилизации лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать предварительно заполненный шприц, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе.

**[0308]** В некоторых вариантах осуществления набор содержит флакон, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе (например, приготовленных в виде водной композиции, например, водной фармацевтической композиции).

**[0309]** В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать инструкции для выполнения любого из способов, описанных в данном документе.

### **Генетически модифицированные клетки**

**[0310]** В настоящем изобретении также предложена клетка (например, клетка животного, например, клетка млекопитающего, например, клетка примата, например, клетка человека), которая включает любую из нуклеиновых кислот, конструкций или композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку человека (например, поддерживающую клетку человека или волосковую клетку человека). В других вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку млекопитающего, отличного от человека (например, клетка обезьян, клетка кошачьих, клетка псовых и т. д.). Специалисту в данной области техники будет понятно, что нуклеиновые кислоты и конструкции, описанные в данном документе, могут быть введены в любую клетку животного (например, поддерживающие или волосковые клетки любого животного, подходящего для ветеринарного вмешательства). В данном документе описаны неограничивающие примеры конструкций и способов введения конструкций в клетки млекопитающих.

**[0311]** В некоторых вариантах осуществления клетка животного может представлять собой любую клетку внутреннего уха, включая волосяные и/или поддерживающие клетки. Неограничивающие примеры таких клеток включают: клетки Генсена, клетки Дейтерса, клетки эндолимфатического мешка и протока, переходные клетки в мешочке, маточке и

ампуле, внутренние и наружные волосковые клетки, клетки спиральной связки, клетки спирального ганглия, клетки спирального выступа, клетки наружного мешочка, маргинальные клетки, промежуточные клетки, базальные клетки, внутренние столбовые клетки, наружные столбовые клетки, клетки Клавдия, внутренние пограничные клетки, внутренние фаланговые клетки или клетки сосудистой полоски.

**[0312]** В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой специализированную клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой волосковую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки или наружную волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой наружную волосковую клетку улитки.

**[0313]** В некоторых вариантах осуществления клетка животного может представлять собой любую клетку глаза, включая поддерживающие клетки. Неограничивающие примеры таких клеток включают палочки, колбочки, пигментированные клетки, горизонтальные клетки, биполярные клетки, амакриновые клетки, ганглиозные клетки, фоторецепторные клетки, клетки Мюллера или клетки сетчатки.

**[0314]** В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой специализированную клетку глаза. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку глаза. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку сетчатки. В.

**[0315]** В некоторых вариантах осуществления животная клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка животного относится к типу клеток, который эндогенно присутствует у животного, например, у примата и/или человека. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой аутологичную клетку, полученную от животного и культивированную *ex vivo*.

## **Способы**

### **Потеря слуха**

**[0316]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены способы. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в данном документе, во внутреннее ухо (например, в улитку) субъекта. Например, в данном документе предложены способы, которые в некоторых вариантах осуществления включают введение во внутреннее ухо (например, улитку) субъекта (например, животного, например,

млекопитающего, например, примата, например, человека) терапевтически эффективного количества любой описанной в данном документе композиции. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов у субъекта было ранее идентифицировано наличие дефектного гена-мишени в клетке внутреннего уха (например, ген-мишень в поддерживающей и/или слуховой клетке, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности белка-мишени поддерживающей и/или слуховой клетки, кодируемого геном). Некоторые варианты осуществления любого из этих способов дополнительно включают до стадии внесения или введения определение наличия у субъекта дефектного гена-мишени в клетке внутреннего уха. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут дополнительно включать обнаружение мутации у субъекта в гене-мишени клетки внутреннего уха. Некоторые варианты осуществления любого из способов могут дополнительно включать идентификацию или диагностирование у субъекта несиндромальной или синдромальной нейросенсорной тугоухости.

**[0317]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы коррекции дефекта гена-мишени клетки внутреннего уха (например, дефекта в CLRN1) во внутреннем ухе 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 данном документе, причем введение приводит к восстановлению и/или улучшению дефекта гена-мишени клетки внутреннего уха в любой субпопуляции клеток внутреннего уха субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень внутреннего уха может представлять собой сенсорную клетку, например, волосковую клетку, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или любую субпопуляцию клеток внутреннего уха.

**[0318]** В настоящем документе также предложены способы повышения уровня экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха в любой субпопуляции 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 данном документе, причем введение приводит к увеличению уровня экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха (например, белка кларина 1) в любой субпопуляции клеток внутреннего уха субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень внутреннего уха может представлять собой сенсорную клетку, например, волосковую клетку, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или

любую субпопуляцию клеток внутреннего уха.

**[0319]** В настоящем документе также предложены способы лечения потери слуха, например, несиндромальной нейросенсорной тугоухости или синдромальной нейросенсорной тугоухости, у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека), у которого идентифицировано наличие дефектного гена-мишени в клетке внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе способов субъект имеет синдром Ашера типа III.

**[0320]** В настоящем документе также представлены способы восстановления синапсов и/или сохранения спиральных ганглиозных нервов у субъекта, у которого выявлено или диагностировано заболевание внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе.

**[0321]** В настоящем документе также представлены способы, включающие введение композиции, описанной в настоящем документе, например, gAAV-CLRN1, для лечения субъекта, например млекопитающего, например человека, например пациента, с синдромом Ашера III типа. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, доставляется хирургическим путем, например, в улитку.

**[0322]** Также в настоящем документе предложены способы уменьшения размера и/или восстановления вестибулярного водопровода до соответствующего размера. В данном документе также представлены способы восстановления эндолимфатического pH до соответствующего и/или приемлемого уровня у субъекта, у которого выявлено или диагностировано заболевание внутреннего уха, которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций.

**[0323]** Также в данном документе предложены способы, включающие введение во внутреннее ухо субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе.

**[0324]** Также в настоящем документе предложены хирургические способы лечения тугоухости (например, несиндромальной нейросенсорной тугоухости или синдромальной нейросенсорной тугоухости). В некоторых вариантах осуществления способы включают следующие этапы: осуществление в улитке субъекта первого разреза в первой точке разреза; и внутрикохлеарное введение терапевтически эффективного количества любой из

представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

**[0325]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

**[0326]** В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей слуха или с риском потери слуха. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект имеет аутосомно-рецессивную тугоухость, связанную по меньшей мере с одним патогенным вариантом CLRN1. Специалистам в данной области техники будет понятно, что многие различные мутации в CLRN1 могут привести к возникновению патогенного варианта. В некоторых таких вариантах осуществления патогенный вариант вызывает или может вызвать потерю слуха.

**[0327]** В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта, страдающего потерей слуха, будет проведена оценка для определения наличия и местонахождения одной или более мутаций, которые могут вызвать потерю слуха. В некоторых таких вариантах осуществления будет оцениваться статус генных продуктов или функции гена CLRN1 (например, с помощью анализа белка или секвенирования). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном 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 данном документе, животное, субъект или млекопитающее представляет собой взрослого, подростка, молодого человека, ребенка, малыша, младенца или новорожденного. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, животное, субъект или млекопитающее имеет возраст 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110 или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

**[0328]** В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов, способы приводят к улучшению слуха (например, любого из описанных в настоящем документе показателей для определения улучшения слуха) 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.

**[0329]** В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) имеется синдромальная или несиндромальная нейросенсорная тугоухость или существует риск ее развития. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) ранее была выявлена мутация в гене CLRN1. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) имеет любую из мутаций в гене CLRN1, которые описаны в данном документе или известны в данной области техники как ассоциированные с синдромальной или несиндромальной нейросенсорной тугоухостью.

**[0330]** В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как носитель мутации в гене CLRN1 (например, с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлена мутация в гене CLRN1, и у него диагностирована синдромальная или несиндромальная нейросенсорная тугоухость. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлена синдромальная или несиндромальная нейросенсорная тугоухость.

**[0331]** В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как имеющий риск потери слуха (например, риск быть носителем генной мутации, например, мутации в гене CLRN1). 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 вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как носитель мутации в гене CLRN1 (например, с помощью генетического тестирования), которая ранее не была идентифицирована (т. е. не является опубликованным или иным образом известным вариантом CLRN1). В некоторых таких вариантах осуществления идентифицированные мутации могут быть новыми (т. е. ранее не описанными в литературе), и способы лечения субъекта, страдающего или предрасположенного к потере слуха, будут персонализированы в соответствии с мутацией (мутациями) конкретного пациента.

**[0332]** В некоторых вариантах осуществления успешное лечение успешное лечение синдромальной или несиндромальной нейросенсорной тугоухости может быть определено у субъекта с использованием любого из традиционных функциональных тестов слуха, известных в данной области техники. Неограничивающими примерами функциональных тестов слуха являются различные типы аудиометрических тестов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тестирование среднего уха, акустические стволовые вызванные потенциалы и отоакустическая эмиссия).

**[0333]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа две или более доз любой композиции, описанной в данном документе, вносят или вводят в улитку субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение или внесение первой дозы композиции в улитку субъекта, оценку зрительной функции субъекта после введения или введения первой дозы,

и введение дополнительной дозы композиции в улитку субъекта, у которого обнаружено отсутствие функции слуха в пределах нормального диапазона (например, определенную с использованием любого слухового теста, известного в данной области техники).

**[0334]** В некоторых вариантах осуществления любого способа, описанного в данном документе, композиция может быть составлена для интракохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, описанные в данном документе композиции можно вводить посредством интракохлеарного введения или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композиции вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе).

**[0335]** В некоторых вариантах осуществления интракохлеарное введение может быть выполнено с использованием любого из способов, описанных в данном документе или известных в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция может быть введена или внесена в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с использованием визуализации с помощью жесткого эндоскопа 2,5 мм с углом обзора 0 градусов, внешний слуховой канал очищается и круглый нож используется для четкого очертания барабанной перепонки диаметром около 5 мм. Барабанную перепонку поднимают, и осуществляют введение в среднее ухо сзади. Нервы барабанной перепонки идентифицируют и разделяют, а для удаления скутальной кости используют кюретку, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенной или внесенной композиции может быть использован хирургический лазер для небольшой 2-мм фенестрации в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии мембраны через круглое окно композиции. Затем загружают микроинфузионное устройство и доставляют в операционное поле. Устройство направляют к круглому окну, и наконечник помещают внутри костного круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроигл(-ы) в мембрану. Задействуют ножную педаль для обеспечения измеримой, устойчивой инфузии композиции. Затем устройство извлекают, а круглое окно и стремечко заклеивают гель-пенной.

**[0336]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа субъект имеет синдромальную или несиндромальную нейросенсорную потерю слуха или подвержен риску ее развития. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа у субъекта ранее была идентифицирована мутация в гене-мишени клетки внутреннего уха, гене, который может экспрессироваться в поддерживающих клетках и/или волосковых клетках.

**[0337]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа субъект был идентифицирован как носитель мутации в гене-мишени клетки внутреннего уха (например, с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа у субъекта была идентифицирована мутация в гене-мишени клетки внутреннего уха, и у него была диагностирована потеря слуха (например, несиндромальная нейросенсорная потеря слуха или синдромальная нейросенсорная потеря слуха, например, синдром Пендредда или DFNB4). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, у субъекта была выявлена 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) можно определить у субъекта с помощью любого из обычных функциональных тестов слуха, известных в данной области техники. Неограничивающие примеры функциональных тестов слуха включают различные типы аудиометрических анализов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тест среднего уха, слуховой ответ ствола головного мозга и отоакустическая эмиссия).

**[0338]** В некоторых вариантах осуществления клетка субъекта находится в условиях *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления указанную клетку изначально получают от субъекта и культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень клетки внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень волосковой клетки. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень поддерживающей клетки.

**[0339]** В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например, одного, двух или более введений композиций, описанных в данном документе, происходит увеличение экспрессии активного белка-мишени клетки внутреннего уха (например, белка кларина 1). В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного белка-мишени внутреннего уха, как описано в данном документе (например, белка кларина 1), относительно контрольного уровня, например, по сравнению с уровнем экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха до введения композиций, содержащих любую(ые) конструкцию(и), как описано в данном документе.

**[0340]** Способы определения экспрессии и/или активности белка-мишени (например, белка кларина 1) известны в данной области техники. В некоторых вариантах

осуществления уровень экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха можно определять напрямую (например, путем определения белка-мишени клетки внутреннего уха или мРНК-мишени. Неограничивающие примеры методов, которые можно использовать для обнаружения экспрессии и/или активности РНК-мишени или белка-мишени (например, продукта гена CLRN1 и/или белка кларина 1 или его функциональной характерной части), непосредственно включают: ПЦР в реальном времени, Вестерн блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка-мишени клетки внутреннего уха может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха).

**[0341]** В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость раскрытой в данном документе композиции можно оценить при потере слуха. В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, можно оценить у субъекта, раскрытого в настоящем документе.

### Введение

**[0342]** В настоящем документе предложены терапевтические системы доставки для лечения потери слуха (например, несиндромальной нейросенсорной потери слуха или синдромальной нейросенсорной потери слуха). В одном аспекте терапевтическая система доставки включает: i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов на мембране круглого окна внутреннего уха нуждающегося в этом субъекта, и ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

**[0343]** Также в настоящем документе предложены хирургические способы лечения тугоухости (например, несиндромальной нейросенсорной тугоухости или синдромальной нейросенсорной тугоухости). В некоторых вариантах осуществления способы включают следующие этапы: осуществление в улитке человека первого разреза в первой точке разреза; и внутрикохлеарное введение терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

**[0344]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту

в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

**[0345]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает исследование с повышением дозы для оценки безопасности и переносимости у субъектов, например, у млекопитающих, например, у людей, например у пациентов, например, у пациентов с потерей слуха. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в настоящем документе композицию, например, rAAV-CLRN1, вводят согласно схеме дозирования, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает одностороннее или двустороннее интракохлеарное введение дозы, например, как описано в данном документе, композиции, раскрытой в данном документе, например, rAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не менее 0,01 мл, не менее 0,02 мл, не менее 0,03 мл, не менее 0,04 мл, не менее 0,05 мл, не менее 0,06 мл, не менее 0,07 мл, не менее 0,08 мл, не менее 0,09 мл, не менее 0,10 мл, не менее 0,11 мл, не менее 0,12 мл, не менее 0,13 мл, не менее 0,14 мл, не менее 0,15 мл, не менее 0,16 мл, не менее 0,17 мл, не менее 0,18 мл, не менее 0,19 мл или не менее 0,20 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не более 0,30 мл, не более 0,25 мл, не более 0,20 мл, не более 0,15 мл, не более 0,14 мл, не более 0,13 мл, не более 0,12 мл, не более 0,11 мл, не более 0,10 мл, не более 0,09 мл, не более 0,08 мл, не более 0,07 мл, не более 0,06 мл или не более 0,05 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме около 0,05 мл, около 0,06 мл, около 0,07 мл, около 0,08 мл, около 0,09 мл, около 0,10 мл, около

0,11 мл, около 0,12 мл, около 0,13 мл, около 0,14 мл или около 0,15 мл на улитку, в зависимости от популяции. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не менее 0,01 мл, не менее 0,02 мл, не менее 0,03 мл, не менее 0,04 мл, не менее 0,05 мл, не менее 0,06 мл, не менее 0,07 мл, не менее 0,08 мл, не менее 0,09 мл, не менее 0,10 мл, не менее 0,11 мл, не менее 0,12 мл, не менее 0,13 мл, не менее 0,14 мл, не менее 0,15 мл, не менее 0,16 мл, не менее 0,17 мл, не менее 0,18 мл, не менее 0,19 мл или не менее 0,20 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не более 0,30 мл, не более 0,25 мл, не более 0,20 мл, не более 0,15 мл, не более 0,14 мл, не более 0,13 мл, не более 0,12 мл, не более 0,11 мл, не более 0,10 мл, не более 0,09 мл, не более 0,08 мл, не более 0,07 мл, не более 0,06 мл или не более 0,05 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме около 0,05 мл, около 0,06 мл, около 0,07 мл, около 0,08 мл, около 0,09 мл, около 0,10 мл, около 0,11 мл, около 0,12 мл, около 0,13 мл, около 0,14 мл или около 0,15 мл на улитку, в зависимости от популяции.

**[0346]** В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем документе, оценивает безопасность и переносимость возрастающих доз композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, вводимой посредством интракохлеарной инъекции субъекту, например, в возрасте от 18 до 80 лет, с потерей слуха.

**[0347]** В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем документе, оценивает безопасность и переносимость возрастающих доз композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, вводимой посредством интраокулярной инъекции субъекту, например, в возрасте от 18 до 80 лет, с потерей слуха.

**[0348]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает оценку безопасности и переносимости композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления оценка эффективности композиции, описанной в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, для лечения потери слуха, проводится в рандомизированных, контролируемых условиях (с использованием группы параллельного наблюдения без вмешательства).

**[0349]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает оценку безопасности и переносимости композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления оценка эффективности композиции, описанной в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, для лечения потери зрения, проводится в рандомизированных, контролируемых условиях (с использованием группы параллельного наблюдения без

вмешательства).

### Устройства и хирургические способы

**[0350]** Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, технологии (например, системы, способы, устройства и т. д.), которые можно использовать в некоторых вариантах осуществления для лечения глухоты и других заболеваний, нарушений и состояний, связанных со слухом. Примеры таких технологий также включены, например, в WO 2017223193 и WO 2019084145, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, например, настоящее изобретение предлагает терапевтические системы доставки для лечения потери слуха (например, несиндромальной сенсоневральной потери слуха). В некоторых таких вариантах осуществления терапевтическая система доставки может включать: (i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов на мембране круглого окна внутреннего уха субъекта, (ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

**[0351]** Конструкции AAV способны образовывать полноразмерную информационную РНК слухового полипептида в клетке-мишени внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает средство для выполнения хирургического метода, способ, включающий этапы: внутрикохлеарного введения субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективной дозы терапевтической композиции согласно настоящему изобретению. Терапевтическую композицию можно вводить с помощью медицинского устройства, включающего: а) средство для создания одного или нескольких надрезов в мембране круглого окна и б) эффективную дозу терапевтической композиции.

**[0352]** Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, хирургические способы лечения (например, предотвращения, обращения, смягчения, ослабления) потери слуха. В одном аспекте способы включают этапы: проведения в улитке человека первого разреза в точке первого разреза; и внутрикохлеарное введение эффективной дозы терапевтической композиции (например, любой композиции, описанной в настоящем документе), как предусмотрено в настоящем документе. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию (например, любую композицию, описанную в настоящем документе) вводят субъекту в первую точку разреза. В некоторых вариантах осуществления терапевтическую композицию вводят субъекту в первый разрез или через него. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию вводят субъекту в

мембрану овального окна улитки или через нее. В одном варианте осуществления терапевтическую композицию вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее.

**[0353]** Например, в некоторых вариантах осуществления терапевтическую композицию вводят с помощью медицинского устройства, способного создавать множество надрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла включает диаметр, по меньшей мере, около 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить терапевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

#### Способ введения в улитку

**[0354]** Настоящее раскрытие обеспечивает, среди прочего, способ введения в улитку млекопитающего (например, человека) терапевтически эффективного количества любых композиций или систем, описанных в настоящем документе. Также предложены способы увеличения экспрессии функционального белка CLRN1 в клетке (например, волосковой клетке, например, наружной волосковой клетке, например, клетке внутреннего уха, например, нейроне спинномозгового ганглия (SGN)) в улитке млекопитающего (например, человека), которые включают введение в улитку субъекта терапевтически эффективного количества любой композиции, описанной в настоящем документе.

**[0355]** Также предложены способы лечения потери слуха у субъекта (например, у человека), у которого выявлен дефектный (т.е. нефункциональный) продукт гена CLRN1. В некоторых таких вариантах осуществления способы включают введение терапевтически эффективного количества любых композиций, описанных в настоящем документе, в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы лечения могут дополнительно включать введение субъекту кохлеарного имплантата (например, практически одновременно с введением субъекту любой композиции, описанной в настоящем документе).

**[0356]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения включает введение двух или более доз любых композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых таких

вариантах осуществления композиции вводят в улитку млекопитающего или субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ лечения включает введение первой дозы композиции в улитку субъекта, оценку слуховой функции субъекта после введения первой дозы и введение по меньшей мере одной дополнительной дозы композиции в улитку субъекта, если у субъекта обнаруживается, что функция слуха не находится в нормальном диапазоне (например, как определено с использованием любого слухового теста, известного в данной области техники).

**[0357]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения включает интракохлеарное введение. В некоторых таких вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композиции вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления интракохлеарное введение можно осуществлять, как описано в настоящем документе или известно в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить или вводить в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с использованием 0-градусного жесткого эндоскопа диаметром 2,5 мм очищают наружный слуховой проход и используют круглый нож, чтобы резко очертить примерно 5-мм тимпаномеатальный лоскут. Барабанную перепонку поднимают, и осуществляют введение в среднее ухо сзади. Нервы барабанной перепонки идентифицируют и разделяют, а для удаления скутальной кости используют кюретку, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенной или внесенной композиции может быть использован хирургический лазер для небольшой 2-мм фенестрации в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии мембраны через круглое окно композиции. Затем загружают микроинфузионное устройство и доставляют в операционное поле. Устройство направляют к круглому окну, и наконечник помещают внутри костного круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроигл(-ы) в мембрану. Задействуют ножную педаль для обеспечения измеримой, устойчивой инфузии композиции. Затем устройство извлекают, а круглое окно и стремянку заклеивают гелевой пеной. Специалист в данной области техники поймет, что доступны другие варианты или способы интракохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любые такие приемлемые способы могут быть использованы для доставки одной или нескольких композиций и/или лечения одного или нескольких субъектов, как описано в настоящем документе.

**[0358]** В некоторых вариантах осуществления иллюстративное устройство для использования в любом из раскрытых в данном документе способов описано на **фиг. 19-22**.

На **фиг. 19** показано иллюстративное устройство 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Устройство 10 содержит рифленую рукоятку 12 и клей 14 для дистальной рукоятки (например, эпоксидный состав, такой как Loctite 4014), который соединяется с телескопическим держателем 24 иглы гипотубуса. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) может иметь закругленные элементы и/или канавки для улучшения захвата. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) 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 рукоятка 12 (или часть рукоятки) может быть полой, чтобы жидкость могла проходить через устройство 10 во время использования. Устройство 10 может также включать клей 16 для проксимальной рукоятки на проксимальном конце 18 рифленой рукоятки 12, подбор иглы 26 (показанный на **фиг. 20**) со стопором 28 (показанный на **фиг. 20**) на дистальном конце 20 устройства 10 и элемент 22 для снятия натяжения. Элемент 22 для снятия натяжения может состоять из материала Santoprene, материала Pebax, полиуретанового материала, силиконового материала, нейлонового материала и/или термопластичного эластомера. Телескопический держатель 24 иглы гипотубуса окружает и поддерживает изогнутую иглу 38 (показанную на **фиг. 20**), расположенную внутри нее.

[0359] Ссылаясь еще на **фиг. 20**, стопор 28 может состоять из термопластичного материала или пластикового полимера (такого как полимер, отвержденный УФ-излучением), а также из других подходящих материалов и может использоваться для предотвращения слишком глубокого введения изогнутой иглы 38 в ушной канала (например, для предотвращения введения изогнутой иглы 38 в боковую стенку или другую структуру внутреннего уха). Устройство 10 также может включать сужающуюся часть 23, расположенную между рифленой рукояткой 12 и клеем 14 дистальной рукоятки, который соединен с телескопическим держателем 24 иглы гипотубуса. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) может включать сужающуюся часть 23 на дистальном конце части 12 рукоятки. Устройство 10 может также включать в себя трубку 36, плавно соединенную с проксимальным концом 16 устройства 10 и выступающую в качестве линии впуска жидкости, соединяющей устройство с расположенными выше по компонентами (например, насосом, шприцем и/или расположенными выше компонентами, которые в некоторых вариантах осуществления, могут быть соединены с системой управления и/или источником питания (не показан)). В некоторых вариантах осуществления изогнутая игла 38 (показана на **фиг. 20**) проходит от дистального конца 20 через телескопический иглодержатель гипотрубки 24, через сужающуюся часть 23, через рифленую рукоятку 12 и через элемент

для снятия натяжения 22 и плавно соединяется непосредственно с трубкой 36. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 плавно соединяется полым внутренним пространством рифленой рукоятки (например, через телескопический иглодержатель гипотрубки 24), который, в свою очередь, плавно соединяется на проксимальном конце 16 с трубкой 36. В вариантах осуществления, где изогнутая игла 38 не проходит полностью через внутреннюю часть устройства 10, площадь контакта (например, между перекрывающимися вложенными друг в друга гипотрубками 42), допуски и/или герметики между сопрягающимися компонентами должны быть достаточными для предотвращения вытекание терапевтической жидкости из устройства 10 (которое работает при относительно низком давлении (например, от около 1 Па до около 50 Па, или от около 2 Па до около 20 Па, или от около 3 Па до около 10 Па)).

**[0360]** На **фиг. 20** показан вид сбоку подбора 26 изогнутой иглы в соответствии с аспектами раскрытых вариантов осуществления настоящего изобретения. Подбор 26 изогнутой иглы включает иглу 38, которая имеет изогнутую часть 32. Подбор 26 изогнутой иглы также может включать стопор 28, соединенный с изогнутой частью 32. Изогнутая часть 32 включает скошенный под углом кончик 34 на дистальном конце 20 устройства 10 для прокалывания мембраны уха (например, RWM). Игла 38, изогнутая часть 32 и изогнутая под углом верхняя часть 34 являются полыми, так что через них может протекать жидкость. Угол 46 (как показано на **фиг. 22**) изогнутой части 32 может быть разным. Геометрия стопора 28 может быть цилиндрической, дискообразной, кольцеобразной, куполообразной и/или другой подходящей формы. Стопор 28 может быть отформован на изогнутой части 32. Например, стопор 28 может быть расположен концентрически вокруг изогнутой части 32 с использованием адгезива или компрессионного фитинга. Примеры адгезивов включают адгезив, отверждаемый УФ-излучением (такой как Dymax 203A-СТН-F-T), эластомерные адгезивы, термореактивные адгезивы (такие как эпоксидные или полиуретановые) или эмульсионные адгезивы (такие как поливинилацетат). Стопор 28 устанавливается концентрически вокруг изогнутой части 32, так что скошенный под углом кончик 34 вставляется в ухо на желаемую глубину введения. Изогнутая игла 38 может быть сформирована из прямой иглы с использованием пошагового формования, а также других подходящих методов.

**[0361]** На **фиг. 21** показан вид в перспективе иллюстративного устройства 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Трубка 36 может иметь длину от около 1300 мм (размер 11 на **фиг. 21**) до около 1600 мм, или от около 1400 мм до около 1500 мм, или от около 1430 мм до около 1450 мм. Элемент для снятия натяжения 22 может иметь длину от около 25 мм до около 30 мм (размер 15 на **фиг. 21**) или от около 20 мм до около 35 мм.

Рукоятка 12 может иметь длину около 155,4 мм (размер 13 на **фиг. 21**), или от около 150 мм до около 160 мм, или от около 140 мм до около 170 мм. Телескопический иглодержатель гипотрубки 24 может иметь две или более вложенных друг в друга гипотрубок, например три вложенные друг в друга гипотрубки 42А, 42В и 42С, или четыре вложенные друг в друга гипотрубки 42А, 42В, 42С и 42D. Общая длина гипотрубок 42А, 42В, 42С и наконечника в сборе 26 (размер 17 на **фиг. 21**) может составлять от около 25 мм до около 45 мм, или от около 30 мм до около 40 мм, или около 35 мм. Кроме того, телескопический иглодержатель гипотрубки 24 может иметь длину около 36 мм, или от около 25 мм до около 45 мм, или от около 30 мм до около 40 мм. Каждая из трех вложенных друг в друга гипотрубок 42А, 42В и 42С может иметь длину 3,5 мм, 8,0 мм и 19,8 мм, соответственно, плюс или минус около 20%. Самая внутренняя вложенная гипотрубка (или самая узкая часть) телескопического держателя иглы гипотрубки 24 может быть расположена концентрически вокруг иглы 38.

**[0362]** На **фиг. 22** показан вид в перспективе подбора 26 изогнутой иглы, соединенного с дистальным концом 20 устройства 10, в соответствии с аспектами раскрытых вариантов осуществления данного изобретения. Как показано на **фиг. 22**, подбор 26 изогнутой иглы может включать иглу 38, соединенную с изогнутой частью 32. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 может представлять собой одинарную иглу (например, прямую иглу, которую затем изгибают так, что она образует необходимый угол 46). Игла 38 может представлять собой иглу калибра 33 или может включать калибр от около 32 до около 34 или от около 31 до 35. При меньших калибрах необходимо следить за тем, чтобы трубка 36 не перегибалась и не повреждалась. Игла 38 может быть присоединена к рукоятке 12 для безопасного и точного введения иглы 38 во внутреннее ухо. Как показано на **ФИГ. 22**, подбор 26 изогнутой иглы может также включать стопор 28, расположенный вокруг изогнутой части 32. На **фиг. 22** также показано, что изогнутая часть 32 может включать скошенный под углом кончик 34 для прокалывания мембраны уха (например, RWM). Стопор 28 может иметь высоту 48 около 0,5 мм, или от около 0,4 мм до около 0,6 мм, или от около 0,3 мм до около 0,7 мм. Изогнутая часть 32 может иметь длину 52 около 1,45 мм или от около 1,35 мм до около 1,55 мм, или от около 1,2 мм до около 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 скошенного под углом кончика 34 составляет от около 0,5 мм до около 1,7 мм или около от 0,6 мм до около 1,5 мм, или от около 0,7 мм до около 1,3 мм, или от около 0,8 мм до около 1,2 мм. На **фиг. 22** показано, что стопор 28 может иметь цилиндрическую, дискообразную и/или куполообразную геометрию. Специалисту в данной области техники будет понятно, что

можно использовать и другие геометрические формы.

**[0363]** В некоторых вариантах осуществления способ доставки, как раскрыто в настоящем документе, включает синтетический капсид AAV (например, AAV Anc80) для трансдукции клеток внутреннего уха и/или устройство для направленной доставки непосредственно в улитку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции, подходящие для трансдукции клеток внутреннего уха.

**[0364]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

**[0365]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе также раскрыто стерильное одноразовое устройство доставки для интракохлеарного введения для доставки композиции, описанной в настоящем документе, например, rAAV-CLRN1, в перилимфатическую жидкость внутреннего уха через мембрану круглого окна с вентиляционным отверстием, расположенным в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления при таком подходе к интракохлеарному введению композицию, описанную в настоящем документе, например, rAAV-CLRN1, могут вводить в барабанную лестницу через мембрану круглого окна с отверстием в основании стремени внутри овального окна, так что композиция перфузируется через барабанную лестницу, затем через вестибулярную лестницу через соединение в геликотреме и следует по пути жидкости к отверстию в основании стремени (фиг. 11А-11В).

### Способы лечения субъекта

**[0366]** Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, что технологии, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения основного заболевания и/или симптомов у субъекта, страдающего синдромом Ашера III типа или подверженного риску его возникновения, характеризующегося потерей слуха.

**[0367]** В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъект, страдающий синдромом Ашера III типа или подверженный риску его возникновения, характеризующийся потерей слуха.

**[0368]** В некоторых вариантах осуществления введение конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в настоящем документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в настоящем документе, субъекту может облегчить и/или улучшить один или несколько симптомов, связанных с синдромом Ашера III типа, характеризуется потерей слуха. Симптомы могут включать, например, потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень интралабиринтного белка, гидропс эндолимфатической системы, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, непреодолимую головную боль, невралгию лица, невралгию тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка и/или смерть.

**[0369]** В некоторых вариантах осуществления синдром Ашера типа III, характеризующийся потерей слуха, связан с генной мутацией (например, делеционной мутацией, мутацией сдвига рамки считывания, нонсенс-мутацией, гипоморфной мутацией, гиперморфной мутацией, неоморфной мутацией, абберрантной сверхэкспрессией, абберрантной недостаточной экспрессией и др.). В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий синдромом Ашера III типа или подверженный риску его возникновения, характеризующимся потерей слуха, может иметь мутацию в гене CLRN1, которая может быть охарактеризована, как описано в настоящем документе.

**[0370]** В некоторых вариантах осуществления определяют генетические и/или симптоматические характеристики субъекта до, во время и/или после лечения с помощью технологий, описанных в данном документе (например, с ПЦР в реальном времени,

количественной ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммуногистохимии, масс-спектрометрии или иммунофлуоресценцией, непрямого фенотипического определения экспрессии гена и/или белка (например, с помощью функциональных тестов слуха, ABR, DPOAE и т. д.) и т. д.). В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от синдрома Ашера III типа, характеризующегося потерей слуха, или подверженный риску его развития, может иметь связанное с ним болезненное состояние, охарактеризованное с помощью взятия образцов тканей (например, содержащих одну или более клеток внутреннего уха, например, содержащих одну или более волосковых клеток и /или одну или несколько поддерживающих клеток). В некоторых вариантах осуществления ткани оценивают с помощью морфологического анализа для определения морфологии волосковых клеток и/или поддерживающих клеток до, во время и/или после выполнения любых технологий (например, методологий, например, композиций, например, композиций, содержащих конструкции, и/или частицы и т.д.), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используются *in-vitro* или *ex-vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или более анализов одного или более белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или более образцах субъекта или клеточных популяциях *in-vitro*.

**[0371]** В некоторых вариантах осуществления введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе, улучшает иммуногистохимическую оценку пациента (например, результаты тестов, как описано выше) по сравнению с результатами иммуногистохимических анализов, выполненных до лечения с помощью технологий, описанных в данном документе, или при сравнении с контрольной популяцией.

#### Лечение субъекта для улучшения симптомов синдрома Ашера III типа

**[0372]** В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий синдромом Ашера III типа или подверженный риску его возникновения, характеризующийся потерей слуха, может получать режим лечения, характеризующийся нарушением функции слуха. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией слуха, при этом такая функция слуха определяется у индивидуума с

использованием измерений слуховой реакции ствола мозга (ABR) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией слуха, при этом такая функция слуха определяется у индивидуума путем измерения отоакустической эмиссии продукта искажения (DPOAE) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения слуха проводят на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений ответов, 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 с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в настоящем документе, улучшает оценку результатов тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в настоящем документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

#### Оценка потери слуха и восстановления

[0373] В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с использованием измерений акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR). Снижение порога ABR по сравнению с эталоном, наличие (например, обнаружение) порога ABR и/или нормальная морфология ABR указывают на улучшение слуха. В некоторых вариантах осуществления слух проверяют путем измерения отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (DPOAE). Снижение порога DPOAE по сравнению с эталоном, наличие (например, обнаружение) порога DPOAE и/или нормальная морфология DPOAE указывают на улучшение слуха. В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений ответов, 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 с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

**[0374]** В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется с помощью распознавания спектра речевых сигналов или определяется логопедом. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется тестированием 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 вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тимпанометрии. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется любой комбинацией анализов слуха, известной в данной области техники. 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 того же субъекта и/или известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии и/или анализ до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения в распознавании спектра речевых сигналов, тестировании чистого тона, тестировании костной проводимости, тестировании акустического рефлекса и/или измерениях методом тимпанометрии по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах осуществления распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии проводят после проведения лечения и через

регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

#### Способы характеристики болезненного состояния

**[0375]** Термин «мутация в гене CLRN1» относится к модификации известного согласованного функционального гена CLRN1, которая приводит к продукции белка кларина 1, имеющего одну или несколько из: делеции в одной или нескольких аминокислотах, одной или нескольких аминокислотных замен и одной или нескольких аминокислотных вставок по сравнению с консенсусным функциональным белком кларином 1, и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка кларина 1 в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка кларина 1 в клетке млекопитающего без мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к продукции белка кларина 1, имеющего делецию одной или более аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к сдвигу рамки считывания в гене CLRN1. Термин «сдвиг рамки считывания», как известно в данной области техники, охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления сдвиг рамки считывания может привести к образованию нефункционального белка. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация может быть нонсенс-мутацией (т.е. приводит к преждевременному стоп-кодону в экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к образованию усеченного белка (по сравнению с соответствующим консенсусным функциональным белком), который может быть функциональным или может быть не функциональным. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК CLRN1 или белка кларина 1, или как мРНК, так и белка. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к образованию измененного белка кларина 1, имеющего потерю или снижение одной или более биологических активностей (функций) по сравнению с консенсусным функциональным белком кларином 1.

**[0376]** В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одного или более нуклеотидов в ген CLRN1. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной и/или контрольной последовательности гена кларина 1, т.е. части гена, которая не является кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления мутация в регуляторной и/или контрольной последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена CLRN1. В некоторых вариантах осуществления мутация

находится в известном гетерологичном гене, о котором известно, что он взаимодействует с белком кларином 1, или геном CLRN1.

**[0377]** Способы генотипирования и/или обнаружения экспрессии или активности мРНК CLRN1 и/или белка кларина 1 известны в данной области техники (см., например, Ito et al., World J Otorhinolaryngol. 2013 May 28; 3(2): 26–34, и Roesch et al., Int J Mol Sci. 2018 Jan; 19(1): 209, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК CLRN1 или белка кларина 1 может быть определен напрямую (например, обнаружение белка кларина 1, обнаружение мРНК CLRN1 и т. д.). Неограничивающие примеры методик, которые можно использовать для обнаружения экспрессии и/или активности CLRN1 напрямую, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка CLRN1 и/или кларина 1 может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха, ABR, DPOAE и т. д.).

**[0378]** В некоторых вариантах осуществления образцы ткани (например, содержащие одну или более клеток внутреннего уха, например, содержащие одну или более волосковых клеток, и/или одну или более поддерживающих клеток) можно оценивать с помощью морфологического анализа для определения морфологии клеток глаза, и/или волосковых клеток и/или поддерживающих клеток до и после введения любых агентов (например, композиций, например, композиций, содержащих конструкции и/или частицы и т.д.), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используются *in vitro* или *ex vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или более анализов одного или более белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или более образцах субъекта или клеточных популяциях *in vitro*.

#### Оценка потери слуха, шума в ушах, головокружения и восстановления симптомов

**[0379]** В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют у индивидуума с помощью измерений акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах функция слуха определяется у индивидуума

путем измерения оптоакустической эмиссии продукта искажения (DPOAE) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений ответов, 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 с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

**[0380]** В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется с помощью распознавания спектра речевых сигналов или определяется логопедом. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется тестированием 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 вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тимпанометрии. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется любой комбинацией анализов слуха, известной в данной области техники. 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 того же субъекта и/или известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии и/или анализ до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения в распознавании спектра речевых сигналов, тестировании чистого тона, тестировании

костной проводимости, тестировании акустического рефлекса и/или измерениях методом тимпанометрии по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах осуществления распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

**[0381]** В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых в данном документе способов включает оценку поведенческой аудиометрии. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает аудиометрию чистого тона с воздушными и костными кривыми с соответствующей маскировкой, речевую аудиометрию, слова в тишине или слова в шуме. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает электрофизиологическую аудиометрию с помощью тестирования акустических стволовых вызванных потенциалов. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает стандартизированные опросники: NHIA: опросник повреждений слуха для взрослых, DHI: шкала для оценки головокружения и мнестических функций, THI: опросник шума в ушах, PANQOL: качество жизни (QoL) при Пенсильванской невrome слухового нерва.

**[0382]** В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов безопасность и эффективность можно контролировать путем оценки отологических, вестибулярных и системных нежелательных явлений, а также параметров гематологии, клинической химии и/или анализа мочи. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, дополнительные оцениваемые параметры будут включать уровни белка CLRN1 в крови и конструкцию ДНК в мазках из ушей, мазках из носа, слюне и крови. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, также может быть собрана кровь для оценки потенциальных гуморальных иммунных ответов на капсид и трансгенный продукт.

**[0383]** Тест ABR измеряет, реагируют ли улитка, улитковый нерв и ствол мозга животного на каждый звуковой раздражитель, и часто используется как мера здоровья уха. Этот же базовый тест обычно используется для проверки слуха новорожденных детей в больницах и является стандартным тестом слуха, используемым для лабораторных животных. В некоторых вариантах осуществления тест ABR включает инъекцию мышам внутрибрюшинной дозы анестетика кетамина/ксилазина, чтобы свести к минимуму двигательные и мышечные артефакты и облегчить размещение измерительных электродов. В некоторых вариантах осуществления тест ABR (при выполнении с DPOAE одновременно

и в обоих ушах) занимает приблизительно 45 минут, поэтому иногда требуется бустерная доза анестетика. В некоторых вариантах осуществления начальная доза анестетика состоит из кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг) внутривенно и, при необходимости, бустерной дозы только кетамина, которая состоит из  $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$  исходной дозы кетамина. В некоторых вариантах осуществления повторное введение дозы ксилазина не выполняется на основании рекомендаций ветеринара. В некоторых вариантах осуществления трансдермальные регистрирующие электроды через поверхность кожи размещают в трех стандартных местах (на макушке черепа на равном расстоянии между ушами, над сосцевидным отростком за ушной раковиной на тестовом ухе и над сосцевидным отростком позади ушной раковины для противоположного уха для заземляющего электрода). В некоторых вариантах осуществления стимулы состоят из низкочастотных (8 кГц), средних (16 кГц) и высокочастотных (32 кГц) стимулов чистого тона (нарастание и падение на 0,1 мс, продолжительность 1,5 мс) от 10 до 80 дБ УЗД в восходящем направлении с шагом 5 дБ. В некоторых вариантах осуществления стимулы будут предъявляться со скоростью 30 импульсов в секунду, и на каждом уровне стимула будет получено 512 средних значений без артефактов. В некоторых вариантах осуществления АBR собирали в 2-3 отдельных момента времени, в зависимости от группы; на исходном уровне и на конечной неделе 4-6 с подгруппой животных, также протестированных через 3 недели после операции. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к измерению самой низкой интенсивности каждой частоты стимула, которую ствол головного мозга мог надежно обработать (порог), можно измерить амплитуду волны I в ответ на надпороговые стимулы для оценки целостности афферентного потока информации от волосковых клеток улитки к слуховому нерву. В некоторых вариантах пороги АBR могут предоставлять важную информацию о самом низком уровне звука, который проходит через ухо животного и обрабатывается стволом мозга, надпороговые ответы в амплитуде волны АBR I все чаще используются в качестве показателя целостности ленточной синаптической связи между основанием внутренних волосковых клеток и дендритами слухового нерва.

**[0384]** ДРОАЕ — это звуки, создаваемые движением наружных волосковых клеток улитки, которые измеряются неинвазивно в ушном канале с помощью комбинации преобразователя и микрофона. В некоторых вариантах осуществления размер вызванных ДРОАЕ является полезной мерой функции наружных волосковых клеток. Этот же базовый тест также обычно используется для проверки слуха новорожденных детей в больницах и является стандартным тестом слуха, используемым для лабораторных животных. В некоторых вариантах осуществления в ухо подаются два основных тона ( $f_1$  и  $f_2$ ), вызывающие механические вибрации, которые вызывают изменения давления в улитковых

жидкостях на частоте стимула и искажения. В некоторых вариантах осуществления эти изменения давления приводят в движение ухо в обратном направлении, активируя среднее ухо, а затем барабанную перепонку для воспроизведения звука в слуховом проходе. В некоторых вариантах осуществления DPOAE собирают на тех же тестовых частотах, которые используются в ABR (8, 16, 32 кГц), и под анестезией для ABR. В некоторых вариантах осуществления центр  $f_2$  находится на частотах 8, 16 и 32 кГц, тогда как  $f_1 = f_2 * 0,8 + 10$  дБ. В некоторых вариантах осуществления на каждой частоте тоны представлены в диапазоне от 10 до 80 дБ SPL с возрастающим приращением в 5 дБ. В некоторых вариантах осуществления DPOAE оценивают функцию наружных волосковых клеток и поэтому обычно используются в качестве надпороговой оценки силы ответа, измеряемого как амплитуда ответа на выброс продукта искажения. В некоторых вариантах осуществления используются все три тестовые частоты. В некоторых вариантах осуществления надежные ответы продукта искажения могут быть получены не для каждой тестируемой частоты, в таких случаях может быть выполнен соответствующий анализ.

#### Оценка концентрации белка CLRN1 в биологических образцах

**[0385]** В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают оценку концентраций белка CLRN1 в одном или нескольких биологических образцах от индивидуума до, во время и/или после лечения композициями, описанными в настоящем документе.

**[0386]** В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например, одного, двух или более введений композиций, описанных в данном документе, происходит увеличение экспрессии белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного белка CLRN1, как описано в данном документе, по сравнению относительно контрольного уровня, например, по сравнению с уровнем экспрессии белка CLRN1 до введения композиций, содержащих любую(ые) конструкцию(и), как описано в данном документе.

**[0387]** Способы определения экспрессии и/или активности РНК-мишени и/или белка известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха можно определить напрямую (например, определение белка-мишени клетки внутреннего уха или мРНК-мишени). Неограничивающие примеры способов, которые можно использовать для непосредственного обнаружения экспрессии и/или активности РНК-мишени или белка, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых

вариантах осуществления экспрессия белка-мишени клетки внутреннего уха может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха).

**[0388]** В некоторых вариантах осуществления проводят анализ биораспределения и/или выделения частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, содержащая дефектную по репликации гAAV-CLRN1 частицу гAAV, предназначенную для доставки кДНК, например, для экспрессии белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV, как описано в настоящем документе, используется для лечения субъекта, например человека, например пациента, с синдромом Ашера III типа. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в настоящем документе композицию вводят интракохлеарным путем. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в виде низкой дозы частиц гAAV (например, согласно анализу векторного генома с помощью количественной ПЦР). В некоторых вариантах осуществления раскрытую в настоящем документе композицию вводят в локализованный участок тела. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что композиция, раскрытая в настоящем документе, приведет к ограниченному распространению по сосудам и системному воздействию. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, приводит к более высоким уровням последовательностей конструкций в улитке. В некоторых вариантах осуществления раскрытая в данном документе композиция приводит к более низким, но поддающимся обнаружению уровням в большинстве других собранных тканей и жидкостей. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций обычно снижались в целом на шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций снижаются со временем в образцах крови, например, через один месяц после интракохлеарного введения композиции, раскрытой в настоящем документе.

**[0389]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, собирают и/или оценивают соответствующие жидкости для биораспределения и выделения (например, кровь, сыворотку, мочу, слюну, мазки из носа и ушей и жидкость ЦСЖ). В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов собирают и/или оценивают ткани, не являющиеся мишенями. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что вариант капсида будет определять тропизм. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, содержит вариант капсида, например, вариант капсида AAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что доставка композиции, описанной в настоящем документе, содержащей вариант капсида, например, одним и тем же путем

введения, в том же составе частиц и/или в эквивалентных или меньших дозах частиц, не приведет к различиям в биораспределении и выделении паттернов.

**[0390]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, например, rAAV-CLRN1, вводится на уровне менее примерно  $2E12$  общих vg/улитка. В некоторых вариантах осуществления доза композиции, раскрытой в настоящем документе, зависит, например, от ограничений объема и концентрации частиц rAAV.

**[0391]** Напротив, в клинических испытаниях с использованием частиц rAAV было доставлено более  $1E14$  мкг/кг через системные пути введения, в некоторых случаях у участников младше 6 месяцев (AveXis 2019, включено в настоящий документ в полном объеме в качестве ссылки). Другие локальные доставки с относительно низкими дозами частиц rAAV не сообщали об обширном биораспределении за пределами области-мишени, например, по всему телу, или об обширном выносе частиц rAAV (выведение; обычно измерение концентрации базовой конструкции ДНК с помощью таких методов, как количественной ПЦР). Например, сообщалось о низком уровне распределения Luxturna® за пределами целевой области глаза (в частности, в зрительном нерве глаза, в который были введены частицы, перекресте зрительных нервов, селезенке и печени, а также спорадически в лимфатических узлах исследуемых животных) для двустороннего введения Luxturna® в дозе  $7,5E11$  vg/глаз. Аналогичным образом, в фазе 3 клинических испытаний частицы rAAV выделялись кратковременно и в небольших количествах со слезами у 45% участников; он был обнаружен, также на низких уровнях, в образцах сыворотки (но не цельной крови) 10% участников в дни сразу после субретинального введения Luxturna®, доставляемого двусторонне в дозе  $1,5E11$  vg/глаз (см., например, Russell 2017; Spark Therapeutics 2017, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

**[0392]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает оценку распределения последовательностей частиц rAAV в крови (например, сыворотке и цельной крови) с течением времени после одностороннего введения в улитку с использованием, например, проверенного метода количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления для оценки выделения у субъекта будут собираться дополнительные образцы (например, мазки из наружного слухового прохода, мазки из носа, слюна и моча). В некоторых вариантах осуществления образец берут у субъекта до тех пор, пока не будут получены по меньшей мере три последовательных отрицательных образца.

**[0393]** В некоторых вариантах осуществления белки, коррелирующие с потерей слуха, измеряют до, во время и/или после лечения композициями и/или способами, описанными в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления такие белки,

ассоциированные с потерей слуха, включают:  $\mu$ -кристаллин (CRYM), белок 2, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP2), С-область  $\gamma$ -4-цепи иммуноглобулина (Ig), С-область  $\kappa$ -цепи Ig, комплемент С3, тяжелая константа  $\gamma$  3 иммуноглобулина и/или хемокиновый рецептор-4 (CXCR4).

**[0394]** В некоторых вариантах осуществления измеряют иммуногенность по отношению к капсидам и/или частицам AAV. Иммуногенность капсидов и/или частиц AAV, доставленных в локализованные области, и в относительно низких дозах по сравнению с системными применениями, как правило, не приводила к специфическим образцам иммунных ответов; важно отметить, что ответы, наблюдаемые с помощью как гуморального, так и клеточно-опосредованного иммунологического мониторинга (например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [ИФА]/анализа нейтрализующих антител [NAb] и точечного иммуноферментного анализа [ELISPOT] соответственно), преимущественно не имели клинической корреляции для пути(-ей) введения (ROA), которые обеспечивают некоторую иммунологическую защиту (например, прямое введение в головной мозг).

**[0395]** Ожидается, что в некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, интракохлеарный ROA, например, у видов с незапатентованным водопроводом улитки (например, у ННР и человека), будет обеспечивать аналогичный уровень защиты. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, субъект будет получать короткий периоперационный курс иммуномодулирующего режима, например, системных пероральных кортикостероидов, в течение приблизительно 17 дней, начиная за 3 дня до введения композиций, раскрытых в настоящем документе, например, rAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий режим уменьшает воспаление, связанное с процедурой хирургического введения. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая схема также может дополнительно снижать вероятность иммунной реакции либо на капсид (например, AAV Anc80), либо на основную конструкцию (например, трансгенный продукт, например, белок CLRN1).

**[0396]** В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, дополнительно включает оценку гуморального иммунитета (например, ответов антител) в ответ на введение композиции, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления оценивается влияние ранее существовавшего иммунитета, определенного, например, по уровням NAb в сыворотке, на трансдукцию композиций, раскрытых в настоящем документе, при доставке через внутрикохлеарный ROA. В некоторых вариантах осуществления ранее существовавшие уровни NAb не ингибируют

трансдукцию частиц AAV, доставляемых интракохлеарным путем введения. В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, дополнительно включает оценку сыворотки на потенциальные системные гуморальные ответы как на капсид AAV, так и/или на трансгенный продукт (например, белок). В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от оценки системных гуморальных ответов, может быть разработан интервал лечения для двустороннего интракохлеарного введения композиции, раскрытой в настоящем документе, например, gAAV-CLRN1.

**[0397]** В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, не приводит к цитотоксическим Т-клеточным ответам, например, на частицу AAV, капсид и/или продукт конструкции (например, базового трансгена) из частиц gAAV, доставляемых через локальный путь введения (ROA), например, интракохлеарное введение. Например, в маркировке Luxturna® указано, что ни у одного субъекта не было клинически значимого ответа цитотоксических Т-клеток (Spark Therapeutics 2017, включено в настоящий документ в полном объеме в качестве ссылки); отдельные положительные результаты анализа ELISPOT на интерферон-гамма (IFN-gamma) были получены в ходе программы клинических исследований (Bennett 2012, полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки), но значимость этих изолированных результатов неизвестна, поскольку клинической воспалительной реакции не наблюдалось и в клинической программе не наблюдалось дозолимитирующей токсичности.

**[0398]** В определенных вариантах осуществления измеряют и собирают фармакокинетику любой из композиций или продуктов композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов композицию, раскрытую в данном документе, вводят местно. В некоторых вариантах осуществления локальная доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, приводит к снижению вероятности возникновения любого одного или нескольких неблагоприятных нецелевых эффектов. В некоторых вариантах осуществления локальная доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, не приводит к каким-либо неблагоприятным нецелевым эффектам. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, за субъектом наблюдают путем мониторинга белка CLRN1 в сыворотке (например, с помощью электрохемилюминесцентного анализа), основных показателей жизнедеятельности, анализа мочи и/или клинической химии. В некоторых вариантах осуществления наблюдение за субъектом, которому вводят раскрытую в настоящем документе композицию, позволяет осуществлять раннее вмешательство и/или минимизировать любые нецелевые эффекты.

**[0399]** В некоторых вариантах осуществления после введения композиции, как описано в настоящем документе, сыворотку можно собрать и проанализировать для измерения белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления такие измерения могут проводиться до введения композиции (базовый уровень), на 2-й неделе после введения и ежемесячно в течение соответствующей продолжительности (например, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или более 5 лет). В некоторых вариантах осуществления белок CLRN1 не будет обнаруживаться в сыворотке индивидуума на исходном уровне или в любой момент времени после введения у индивидуумов, которые получили внутрикохлеарную доставку либо носителя, либо низкой дозы частиц rAAV-CLRN1, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, получающего композицию, описанную в настоящем документе, с помощью способа, описанного в настоящем документе, при более высокой дозе rAAV-CLRN1, белок CLRN1 может обнаруживаться в сыворотке на уровнях либо ниже предела обнаружения или количественного определения, либо на уровнях ниже зарегистрированного биологически активного диапазона (от 11 нг/мл до 27 нг/мл [Genentech 2017, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки]).

**[0400]** В некоторых вариантах осуществления любого способа, раскрытого в настоящем документе, способ включает сбор и/или оценку сыворотки на наличие белка CLRN1 с использованием (например, электрохемилюминесцентного анализа, как описано в настоящем документе).

#### Способы получения

**[0401]** Системы AAV, как правило, хорошо известны в данной области техники (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); and Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4):699-708 (2012), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Способы создания и использования конструкций AAV описаны, например, в патенте США №№ 5139941, 4797368 и заявке на подачу PCT US 2019/060328, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[0402]** Способы получения вирусных конструкций известны в данной области техники. 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; рекомбинантную конструкцию AAV, состоящую из инвертированных концевых повторов

(ITR) AAV и кодирующей последовательности; и/или достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать рекомбинантную конструкцию AAV в капсидные белки AAV.

**[0403]** В некоторых вариантах осуществления компоненты для культивирования в клетке-хозяине для упаковки конструкции AAV в капсиде AAV могут быть введены в клетку-хозяин в транс. В качестве альтернативы, любой один или более компонентов (например, рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и/или хелперные функциональные элементы) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована в возможность содержать один или более компонентов, с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления такая стабильная клетка-хозяин содержит такой(-ие) компонент(-ы) под контролем индуцибельного промотора. В некоторых вариантах осуществления такой(-ие) компонент(-ы) может(могут) находиться под контролем конститутивного промотора. В некоторых вариантах осуществления выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть получена стабильная клетка-хозяин, которая происходит из клеток НЕК293 (которые содержат хелперные функциональные элементы Е1 под контролем конститутивного промотора), но которые содержат белки гер и/или сар под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть созданы специалистом в данной области техники с помощью обычных методов.

**[0404]** Рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функциональные элементы, необходимые для продуцирования AAV по данному изобретению, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (конструкции). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами, и включает генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы (см., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая полностью включена в данный документ 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 № 5 478 745, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

**[0405]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с использованием метода тройной трансфекции (например, как описано в патенте США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантной конструкцией AAV (содержащей кодирующую последовательность), подлежащей упаковке в частицы AAV, конструкцией, обеспечивающей хелперную функцию для AAV, и конструкцией, обеспечивающей вспомогательную функцию. Конструкция, обеспечивающая хелперную функцию для AAV, кодирует последовательности, обеспечивающие «хелперную функцию для AAV» (т. е. гер и сар), которые функционируют *in trans* для продуктивной репликации и инкапсулирования AAV. В некоторых вариантах осуществления хелперная функциональная конструкция AAV поддерживает эффективное продуцирование конструкции AAV без образования каких-либо детектируемых частиц AAV дикого типа (то есть частиц AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры конструкций, подходящих для применения в настоящем раскрытии, включают rHLP19 (см., например, патент США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки) и конструкцию rРербсарб (см., например, патент США № 6 156 303, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). Вспомогательная функциональная конструкция кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функций, не являющихся производными AAV, от которых зависит репликация AAV (то есть, «вспомогательные функциональные элементы»). Вспомогательные функции могут включать те функции, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, те части, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадийно-специфическом сплайсинге мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии кэпа и сборке капсида AAV. Вирусные вспомогательные функциональные элементы могут быть приобретены из любого из известных хелперных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

**[0406]** Дополнительные способы создания и выделения вирусных конструкций AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-производитель временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В другой системе паковую линию клеток, которая стабильно поставяет гер и сар, временно

трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления AAV — хелперные функциональные элементы (т. е. аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимеразы вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

**[0407]** В некоторых вариантах осуществления определяют титры вирусных конструкций после очистки. В некоторых вариантах осуществления титр определяют с помощью количественной ПЦР. В определенных вариантах осуществления для определения уровня конструкции используют зонд TaqMan, специфичный для конструкции. В определенных вариантах осуществления зонд TaqMan представлен SEQ ID NO: 65, а праймеры для прямой и обратной амплификации представлены SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно.

**[0408] Иллюстративный зонд TaqMan для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 65)**

/56-FAM/TAATTCCAA/ZEN/CCAGCAGAGTCAGGGC/3IABkFQ/

**[0409] Иллюстративный праймер для прямой кПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 66)**

GATACAGCTAGAGTCCTGATTGC

**[0410] Иллюстративный праймер для обратной кПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 67)**

GATCTGCCAAGTACCTCACTATG

**[0411]** Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция по 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 данный документ посредством ссылки. Как правило, для доставки описанной в данном документе кодирующей последовательности можно использовать любую частицу AAV. Однако серотипы имеют разные тропизмы, например, они преимущественно инфицируют разные ткани. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV представляет собой самокомплементарную конструкцию AAV.

**[0412]** В настоящем изобретении предложены, среди прочего, способы изготовления 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 использоваться в качестве реципиента хелперной конструкции AAV, минигенной плазмиды AAV, вспомогательной функциональной конструкции и/или другого ДНК-переносчика, связанного с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, используемый в данном документе термин «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 или по комплементарной последовательности геномной или общей ДНК с исходной родительской клеткой вследствие природных, случайных или умышленных мутаций.

**[0413]** Дополнительные способы получения и выделения частиц AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В другой системе паковую линию клеток, которая стабильно поставяет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, частицы AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления частиц AAV — хелперные функциональные элементы (т. е. аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимеразы вируса герпеса) также поставяются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные

функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

**[0414]** В еще одной системе кодирующая последовательность, фланкированная ITR, и гены гер/сар вводятся в клетки-хозяева насекомых путем инфицирования конструкциями на основе бакуловируса. Такие системы продукции известны в данной области техники (см. в целом, например, Zhang et al., 2009, Human Gene Therapy 20:922-929, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Способы получения и использования этих и других систем продукции AAV также описаны в патентах США № 5 139 941; 5 741 683; 6 057 152; 6 204 059; 6 268 213; 6 491 907; 6 660 514; 6 951 753; 7 094 604; 7 172 893; 7 201 898; 7 229 823; и 7 439 065, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

#### Потеря зрения

**[0415]** Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены способы. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в данном документе, в глаз субъекта. Например, в данном документе предложены способы, которые в некоторых вариантах осуществления включают введение в глаз субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека) терапевтически эффективного количества любой описанной в данном документе композиции. В некоторых вариантах осуществления любого из этих способов у субъекта было ранее идентифицировано наличие дефектного гена-мишени в клетке глаза (например, ген-мишень в поддерживающей клетке и/или клетке глаза, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности белка-мишени поддерживающей клетки и/или клетки глаза, кодируемого геном). Некоторые варианты осуществления любого из этих способов дополнительно включают до стадии внесения или введения определение наличия у субъекта дефектного гена-мишени в клетке глаза. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут дополнительно включать обнаружение мутации в гене-мишени клетки глаза у субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из способов могут дополнительно включать идентификацию или диагностирование у субъекта потери зрения.

**[0416]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы коррекции дефекта гена-мишени клетки глаза (например, дефекта в CLRN1) в

глазу субъекта, например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, причем введение приводит к восстановлению и/или улучшению дефекта гена-мишени клетки глаза в любой субпопуляции клеток глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень глаза может представлять собой сенсорную клетку, например, клетку глаза, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или любую субпопуляцию клеток глаза.

**[0417]** В настоящем документе также предложены способы повышения уровня экспрессии белка-мишени клетки глаза в любой субпопуляции клеток глаза субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека), которые включают: введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, причем введение приводит к увеличению уровня экспрессии белка-мишени клетки глаза (например, белка кларина 1) в любой субпопуляции клеток глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень глаза может представлять собой сенсорную клетку, например, клетку глаза, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или любую субпопуляцию клеток глаза.

**[0418]** В настоящем документе также предложены способы лечения потери зрения, например, вызванной пигментной дистрофией сетчатки, у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека), у которого идентифицировано наличие дефектного гена-мишени в клетке глаза, которые включают: введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе способов субъект имеет синдром Ашера типа III. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе способов субъект имеет пигментную дистрофию сетчатки. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе способов субъект представляет собой человека. Некоторые варианты осуществления любого из представленных в данном документе способов дополнительно включают, до стадии введения, определение того, что субъект имеет дефектный ген CLRN1.

**[0419]** В настоящем документе также представлены способы восстановления синапсов и/или сохранения спиральных ганглиозных нервов у субъекта, у которого выявлено или диагностировано заболевание глаза, которые включают: введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном

документе.

**[0420]** Также в данном документе предложены способы, включающие введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе.

**[0421]** В настоящем документе также представлены способы, включающие введение композиции, описанной в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, для лечения субъекта, например млекопитающего, например человека, например пациента, с синдромом Ашера III типа. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, доставляется хирургическим путем, например, в глаз.

**[0422]** Также в настоящем описании предложены хирургические способы лечения синдрома Ашера типа III или пигментной дистрофии сетчатки, характеризующегося потерей зрения. В некоторых вариантах осуществления способы включают следующие этапы: осуществление в глазу субъекта первого разреза в первой точке разреза; и внутриокулярное введение терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

**[0423]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в сетчатку или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

**[0424]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, любую композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту посредством инъекции в стекловидное тело или субретинальной инъекции, например, как описано Ochakovski et al., «Retinal Gene Therapy: Surgical Vector Delivery in

the Translation to Clinical Trials», Front. Neurosci. April 3, 2017, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, любую композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту, как описано в «OCT – Assisted Delivery of Luxturna» by Ninel Z Gregori and Janet Louise David, <https://www.aaof.org/clinical-video/oct-assisted-delivery-of-luxturna> (19 июля 2018 г.), содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, любую композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту посредством супрахориоидальной доставки (например, с использованием системы субретинальной доставки Orbit™ (Orbit SDS) (Gyroscope Therapeutics)).

**[0425]** В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей зрения или с риском потери зрения. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект имеет аутосомно-рецессивную потерю зрения, связанную по меньшей мере с одним патогенным вариантом CLRN1. Специалистам в данной области техники будет понятно, что многие различные мутации в CLRN1 могут привести к возникновению патогенного варианта. В некоторых таких вариантах осуществления патогенный вариант вызывает или может вызвать потерю зрения.

**[0426]** В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта, страдающего потерей зрения, будет проведена оценка для определения наличия и местонахождения одной или более мутаций, которые могут вызвать потерю зрения. В некоторых таких вариантах осуществления будет оцениваться статус генных продуктов или функции гена CLRN1 (например, с помощью анализа белка или секвенирования). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном 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 данном документе, животное, субъект или млекопитающее представляет собой взрослого, подростка, молодого человека, ребенка, малыша, младенца или новорожденного. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, животное, субъект или млекопитающее имеет возраст 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90,

40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110 или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

**[0427]** В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов, способы приводят к улучшению зрения (например, любого из описанных в настоящем документе показателей для определения улучшения зрения) 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.

**[0428]** В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) имеется потеря зрения или существует риск ее развития. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) ранее была выявлена мутация в гене CLRN1. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) имеет любую из мутаций в гене CLRN1, которые описаны в настоящем документе или известны в данной области техники как связанные с потерей зрения.

**[0429]** В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как имеющий риск потери зрения (например, риск быть носителем генной мутации, например, мутации в гене CLRN1). В некоторых таких вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) может иметь определенные факторы риска потери зрения или риск потери зрения (например, известный родитель-носитель, больной брат или сестра или симптомы потери зрения). В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как носитель мутации в гене CLRN1 (например, с помощью генетического тестирования), которая ранее не была идентифицирована. (т. е. не является

опубликованным или иным образом известным вариантом CLRN1). В некоторых таких вариантах осуществления идентифицированные мутации могут быть новыми (т. е. ранее не описанными в литературе), и способы лечения субъекта, страдающего или предрасположенного к потере зрения, будут персонализированы в соответствии с мутацией (мутациями) конкретного пациента. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлена мутация в гене CLRN1, и у него диагностирована потеря зрения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлена потеря зрения.

**[0430]** В некоторых вариантах осуществления успешное лечение потери зрения можно определить у субъекта с помощью любого из обычных тестов функционального зрения, известных в данной области техники. Неограничивающими примерами тестов функционального зрения являются различные типы анализов зрения (например, тесты глазных мышц, тесты остроты зрения, оценки рефракции, тесты поля зрения, тесты цветового зрения и исследование сетчатки).

**[0431]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа две или более доз любой композиции, описанной в данном документе, вносят или вводят в глаз субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение или внесение первой дозы композиции в глаз субъекта, оценку зрительной функции субъекта после введения или введения первой дозы, и введение дополнительной дозы композиции в глаз субъекта, у которого обнаружено отсутствие зрительной функции в пределах нормального диапазона (например, определенную с использованием любого зрительного теста, известного в данной области техники).

**[0432]** В некоторых вариантах осуществления любого способа, описанного в данном документе, композиция может быть составлена для интраокулярного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить посредством внутриглазного введения, введения в стекловидное тело, субретинального введения, супрахориоидального введения или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композиции вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе).

**[0433]** В некоторых вариантах осуществления интраокулярное введение можно осуществлять с использованием любого из способов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Например, в некоторых вариантах

осуществления композицию можно вводить или вводить в глаз с использованием следующих хирургических методик.

**[0434]** Интегрированная в микроскоп интраоперационная оптическая когерентная томография (ОКТ) используется для создания небольшого предварительного пузырька перед введением вируса (например, чтобы избежать инъекции субретинального пигментного эпителия (RPE) или супрахориальной инъекции при необходимости). Сначала гиалоидную мембрану окрашивают и удаляют с помощью тонкой петли и приподнимают с помощью мягкого силиконового наконечника. Затем в субретинальное пространство вводят сбалансированный солевой раствор и проводят ОКТ-сканирование для проверки фовеолярного истончения. После того, как пузырь сделан, вводят воретиген с помощью канюли без двойного отверстия 25-го калибра. После этого необходимо тщательно контролировать центральную ямку, чтобы избежать чрезмерного растяжения и образования макулярного отверстия. Давление склеры можно использовать для исключения периферических разрывов. Наконец, обмен воздух-жидкость используется для очистки от вируса (см., например, “OCT – Assisted Delivery of Luxturna” by Ninel Z Gregori and Janet Louise David, <https://www.aao.org/clinical-video/oct-assisted-delivery-of-luxturna> (июль 19, 2018 г.), содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

**[0435]** В качестве другого примера, как описано в настоящем документе, для введения или введения описанных композиций в глаз посредством супрахориоидальной инъекции можно использовать систему субретинальной доставки Orbit™ (Orbit SDS) (Gyroscope Therapeutics). См., например, “Orbit Subretinal Delivery System Instructions for Use June 2020”, <https://www.orbitsds.com/wp-content/uploads/2020/08/AW1009028-Rev.-D-US-IFU-No-Cut-Lines.pdf>, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

**[0436]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа субъект имеет потерю зрения или подвержен риску ее развития. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа у субъекта ранее была идентифицирована мутация в гене-мишени клетки глаза, гене, который может экспрессироваться в поддерживающих клетках и/или клетках глаза.

**[0437]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа субъект был идентифицирован как носитель мутации в гене-мишени клетки глаза (например, с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления любого способа, представленного в настоящем документе, у субъекта была идентифицирована мутация в гене-мишени клетки глаза, и у него была диагностирована

потеря зрения (например, синдром Ашера типа III). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, у субъекта была выявлена потеря зрения (например, синдром Ашера типа III). В некоторых вариантах осуществления успешное лечение потери зрения (например, синдрома Ашера типа III) можно определить у субъекта с помощью любого из обычных тестов функционального зрения, известных в данной области техники. Неограничивающие примеры функциональных тестов зрения включают различные типы тестов зрения (например, тесты глазных мышц, тесты остроты зрения, оценки рефракции, тесты поля зрения, тесты цветового зрения и исследование сетчатки).

**[0438]** В некоторых вариантах осуществления клетка субъекта находится в условиях *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления указанную клетку изначально получают от субъекта и культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень глаза. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень клетки глаза. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень поддерживающей клетки.

**[0439]** В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например, одного, двух или более введений композиций, описанных в данном документе, происходит увеличение экспрессии активного белка-мишени клетки глаза (например, белка кларина 1). В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного белка-мишени глаза, как описано в данном документе (например, белка кларина 1), относительно контрольного уровня, например, по сравнению с уровнем экспрессии белка-мишени клетки глаза до введения композиций, содержащих любую(ые) конструкцию(и), как описано в данном документе.

**[0440]** Способы определения экспрессии и/или активности белка-мишени (например, белка кларина 1) известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка-мишени клетки глаза можно определить напрямую (например, определение белка-мишени клетки глаза или мРНК-мишени). Неограничивающие примеры методов, которые можно использовать для обнаружения экспрессии и/или активности РНК-мишени или белка-мишени (например, продукта гена *CLRN1* и/или белка кларина 1 или его функциональной характерной части), непосредственно включают: ПЦР в реальном времени, Вестерн блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка-мишени клетки глаза может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью

функциональных тестов слуха).

**[0441]** В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость композиции, раскрытой в данном документе, можно оценить при потере зрения. В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, можно оценить у субъекта, раскрытого в настоящем документе.

### Введение

**[0442]** В настоящем документе предложены терапевтические системы доставки для лечения синдрома Ашера III типа, характеризующегося потерей зрения. В одном аспекте терапевтическая система доставки включает: i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов в глазу нуждающегося в этом субъекта, и ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

**[0443]** В настоящем документе также предложены терапевтические системы доставки для лечения пигментной дистрофии сетчатки, характеризующейся потерей зрения. В одном аспекте терапевтическая система доставки включает: i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов в глазу нуждающегося в этом субъекта, и ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

**[0444]** Также в настоящем описании предложены хирургические способы лечения синдрома Ашера типа III или пигментной дистрофии сетчатки, характеризующегося потерей зрения. В некоторых вариантах осуществления способ включает этапы: осуществление в глазу субъекта первого разреза в первой точке разреза; и внутриокулярное введение терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

**[0445]** В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в глаз или через него. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в глазу. В некоторых вариантах

осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

**[0446]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает исследование с повышением дозы для оценки безопасности и переносимости у субъектов, например, у млекопитающих, например, у людей, например у пациентов, например, у пациентов с потерей зрения. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в настоящем документе композицию, например, rAAV-CLRN1, вводят согласно схеме дозирования, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает либо интраокулярное введение дозы, например, как описано в данном документе, композиции, раскрытой в данном документе, например, rAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не менее 0,01 мл, не менее 0,02 мл, не менее 0,03 мл, не менее 0,04 мл, не менее 0,05 мл, не менее 0,06 мл, не менее 0,07 мл, не менее 0,08 мл, не менее 0,09 мл, не менее 0,10 мл, не менее 0,11 мл, не менее 0,12 мл, не менее 0,13 мл, не менее 0,14 мл, не менее 0,15 мл, не менее 0,16 мл, не менее 0,17 мл, не менее 0,18 мл, не менее 0,19 мл или не менее 0,20 мл на глаз. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не более 0,30 мл, не более 0,25 мл, не более 0,20 мл, не более 0,15 мл, не более 0,14 мл, не более 0,13 мл, не более 0,12 мл, не более 0,11 мл, не более 0,10 мл, не более 0,09 мл, не более 0,08 мл, не более 0,07 мл, не более 0,06 мл или не более 0,05 мл на глаз. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме около 0,05 мл, около 0,06 мл, около 0,07 мл, около 0,08 мл, около 0,09 мл, около 0,10 мл, около 0,11 мл, около 0,12 мл, около 0,13 мл, около 0,14 мл или около 0,15 мл на глаз, в зависимости от популяции. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не менее 0,01 мл, не менее 0,02 мл, не менее 0,03 мл, не менее 0,04 мл, не менее 0,05 мл, не менее 0,06 мл, не менее 0,07 мл, не менее 0,08 мл, не менее 0,09 мл, не менее 0,10 мл, не менее 0,11 мл, не менее 0,12 мл, не менее 0,13 мл, не менее 0,14 мл, не менее 0,15 мл, не менее 0,16 мл, не менее 0,17 мл, не менее 0,18 мл, не менее 0,19 мл или не менее 0,20 мл на глаз. В некоторых вариантах

осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не более 0,30 мл, не более 0,25 мл, не более 0,20 мл, не более 0,15 мл, не более 0,14 мл, не более 0,13 мл, не более 0,12 мл, не более 0,11 мл, не более 0,10 мл, не более 0,09 мл, не более 0,08 мл, не более 0,07 мл, не более 0,06 мл или не более 0,05 мл на глаз. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме около 0,05 мл, около 0,06 мл, около 0,07 мл, около 0,08 мл, около 0,09 мл, около 0,10 мл, около 0,11 мл, около 0,12 мл, около 0,13 мл, около 0,14 мл или около 0,15 мл на глаз, в зависимости от популяции.

**[0447]** В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящем документе, оценивает безопасность и переносимость возрастающих доз композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, вводимой посредством интраокулярной инъекции субъекту, например, в возрасте от 18 до 80 лет, с потерей зрения.

**[0448]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает оценку безопасности и переносимости композиции, раскрытой в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления оценка эффективности композиции, описанной в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1, для лечения потери зрения, проводится в рандомизированных, контролируемых условиях (с использованием группы параллельного наблюдения без вмешательства).

#### Способы лечения субъекта

**[0449]** Настоящее изобретение предусматривает, среди прочего, что технологии, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения основного заболевания и/или симптомов у субъекта, страдающего синдромом Ашера III типа или пигментной дистрофией сетчатки или подверженного риску их возникновения, характеризующихся потерей зрения.

**[0450]** В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъект, страдающий синдромом Ашера III типа или пигментной дистрофией сетчатки или подверженный риску их возникновения, характеризующихся потерей зрения.

**[0451]** В некоторых вариантах осуществления введение конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в настоящем документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в настоящем документе, субъекту может облегчить

и/или улучшить один или несколько симптомов, связанных с синдромом Ашера III типа или пигментной дистрофией сетчатки, характеризующихся потерей зрения. Симптомы могут включать, например, потерю зрения, потерю периферического зрения, потерю центрального зрения или дегенерацию клеток глаза.

**[0452]** В некоторых вариантах осуществления потеря зрения связана с генной мутацией (например, делеционной мутацией, мутацией сдвига рамки считывания, нонсенс-мутацией, гипоморфной мутацией, гиперморфной мутацией, неоморфной мутацией, абберрантной сверхэкспрессией, абберрантной недостаточной экспрессией и др.). В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий синдромом Ашера III типа или пигментной дистрофией сетчатки или подверженный риску их возникновения, может иметь мутацию в гене CLRN1, которая может быть охарактеризована, как описано в настоящем документе.

**[0453]** В некоторых вариантах осуществления определяют генетические и/или симптоматические характеристики субъекта до, во время и/или после лечения с помощью технологий, описанных в данном документе (например, с ПЦР в реальном времени, количественной ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммуногистохимии, масс-спектрометрии или иммунофлуоресценцией, непрямого фенотипического определения экспрессии гена и/или белка (с помощью функциональных тестов зрения, тестов глазных мышц, тестов остроты зрения, оценок рефракции, тестов поля зрения, тестов цветового зрения, осмотра сетчатки и т. д.)). В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий от потери зрения или подверженный риску ее развития, может иметь связанное с ним болезненное состояние, охарактеризованное с помощью взятия образцов тканей (например, содержащих одну или более клеток глаза, например, содержащих одну или более клеток глаза и /или одну или несколько поддерживающих клеток). В некоторых вариантах осуществления ткани оценивают с помощью морфологического анализа для определения морфологии клеток глаза и/или поддерживающих клеток до, во время и/или после выполнения любых технологий (например, методологий, например, композиций, например, композиций, содержащих конструкции, и/или частицы и т.д.), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используются *in-vitro* или *ex-vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или более анализов одного или более белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или более образцах субъекта или клеточных популяциях *in-vitro*.

[0454] В некоторых вариантах осуществления введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе, улучшает иммуногистохимическую оценку пациента (например, результаты тестов, как описано выше) по сравнению с результатами иммуногистохимических анализов, выполненных до лечения с помощью технологий, описанных в данном документе, или при сравнении с контрольной популяцией.

Лечение субъекта для улучшения симптомов синдрома Ашера III типа или пигментной дистрофии сетчатки

[0455] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий синдромом Ашера типа III или подверженный риску его возникновения, характеризующимся потерей зрения, может получать режим лечения, характеризующийся нарушением функции зрения. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией зрения, при этом такая функция зрения определяется у индивидуума с помощью тестов зрения (например, с помощью тестов функционального зрения, тестов глазных мышц, тестов остроты зрения, оценок рефракции, тестов поля зрения, тестов цветового зрения и исследования сетчатки и т.д.) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией зрения, при этом такая функция зрения определяется у индивидуума путем измерения остроты зрения, как описано в настоящем документе, до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения зрения проводят на одном или обоих глазах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления измерения сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери зрения в сравнении с допустимыми диапазонами потери зрения, определяемыми как нормальное зрение. В некоторых вариантах осуществления у субъекта будут выполняться описанные измерения до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей зрения по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения зрения проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в

настоящем документе, улучшает оценку результатов и болезни тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в настоящем документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

**[0456]** В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий пигментной дистрофией сетчатки или подверженный риску ее возникновения, характеризующейся потерей зрения, может получать режим лечения, характеризующийся нарушением функции зрения. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией зрения, при этом такая функция зрения определяется у индивидуума с помощью тестов зрения (например, с помощью тестов функционального зрения, тестов глазных мышц, тестов остроты зрения, оценок рефракции, тестов поля зрения, тестов цветового зрения и исследования сетчатки и т.д.) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления функциональность режима лечения характеризуется функцией зрения, при этом такая функция зрения определяется у индивидуума путем измерения остроты зрения, как описано в настоящем документе, до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения зрения проводят на одном или обоих глазах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления измерения сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери зрения в сравнении с допустимыми диапазонами потери зрения, определяемыми как нормальное зрение. В некоторых вариантах осуществления у субъекта будут выполняться описанные измерения до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей зрения по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения зрения проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в настоящем документе, улучшает оценку результатов и болезни тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в настоящем документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

**[0457]** В некоторых вариантах осуществления функцию зрения определяют с помощью измерений, включая электроретинограмму, тестирование поля зрения или генетическое тестирование. В некоторых вариантах осуществления сетчатку глаза субъекта исследуют с помощью офтальмоскопа, инструмента, который позволяет получить более широкий и четкий обзор сетчатки. В некоторых вариантах осуществления измерения проводят на одном или обоих глазах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления измерения сравнивают с предыдущими тестами для того же субъекта и/или известными эталонными измерениями, используемыми для определения, например, потери зрения по сравнению с тем, что в данной области техники определяется как нормальное зрение. В некоторых вариантах осуществления у субъекта будут выполняться измерения до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей зрения по сравнению с показателями, выполненными до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

#### Способы характеристики болезненного состояния

**[0458]** Термин «мутация в гене CLRN1» относится к модификации известного согласованного функционального гена CLRN1, которая приводит к продукции белка кларина 1, имеющего одну или несколько из: делеции в одной или нескольких аминокислотах, одной или нескольких аминокислотных замен и одной или нескольких аминокислотных вставок по сравнению с консенсусным функциональным белком кларином 1, и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка кларина 1 в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка кларина 1 в клетке млекопитающего без мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к продукции белка кларина 1, имеющего делецию одной или более аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к сдвигу рамки считывания в гене CLRN1. Термин «сдвиг рамки считывания», как известно в данной области техники, охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления сдвиг рамки считывания может привести к образованию нефункционального белка. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация может быть нонсенс-мутацией (т.е. приводить к преждевременному стоп-кодону в

экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к образованию усеченного белка (по сравнению с соответствующим консенсусным функциональным белком), который может быть функциональным или может быть не функциональным. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК CLRN1 или белка кларина 1, или как мРНК, так и белка. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к образованию измененного белка кларина 1, имеющего потерю или снижение одной или более биологических активностей (функций) по сравнению с консенсусным функциональным белком кларином 1.

**[0459]** В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одного или более нуклеотидов в ген CLRN1. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной и/или контрольной последовательности гена кларина 1, т.е. части гена, которая не является кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления мутация в регуляторной и/или контрольной последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена CLRN1. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в известном гетерологичном гене, о котором известно, что он взаимодействует с белком кларином 1, или геном CLRN1.

**[0460]** Способы генотипирования и/или обнаружения экспрессии или активности мРНК CLRN1 и/или белка кларина 1 известны в данной области техники (см., например, Ito et al., *World J Otorhinolaryngol.* 2013 May 28; 3(2): 26–34, и Roesch et al., *Int J Mol Sci.* 2018 Jan; 19(1): 209, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК CLRN1 или белка кларина 1 может быть определен напрямую (например, обнаружение белка кларина 1, обнаружение мРНК CLRN1 и т. д.). Неограничивающие примеры методик, которые можно использовать для обнаружения экспрессии и/или активности CLRN1 напрямую, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка CLRN1 и/или кларина 1 может быть обнаружена косвенно (например, с помощью тестов функционального зрения, тестов глазных мышц, тестов остроты зрения, оценок рефракции, тестов поля зрения, тестов цветового зрения и исследования сетчатки и т. д.).

#### Оценка концентрации белка CLRN1 в биологических образцах

**[0461]** В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают оценку концентраций белка CLRN1 в одном или нескольких

биологических образцах от индивидуума до, во время и/или после лечения композициями, описанными в настоящем документе.

**[0462]** В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например, одного, двух или более введений композиций, описанных в данном документе, происходит увеличение экспрессии белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного белка CLRN1, как описано в данном документе, по сравнению относительно контрольного уровня, например, по сравнению с уровнем экспрессии белка CLRN1 до введения композиций, содержащих любую(ые) конструкцию(и), как описано в данном документе.

**[0463]** Способы определения экспрессии и/или активности РНК-мишени и/или белка известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка-мишени глаза можно определить напрямую (например, определение белка-мишени клетки глаза или мРНК-) мишени. Неограничивающие примеры способов, которые можно использовать для непосредственного обнаружения экспрессии и/или активности РНК-мишени или белка, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка-мишени клетки глаза может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха).

**[0464]** В некоторых вариантах осуществления проводят анализ биораспределения и/или выделения частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, содержащая дефектную по репликации гAAV-CLRN1 частицу гAAV, предназначенную для доставки кДНК, например, для экспрессии белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV, как описано в настоящем документе, используется для лечения субъекта, например человека, например пациента, с синдромом Ашера III типа. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию вводят интраокулярным путем. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в настоящем документе, вводят в виде низкой дозы частиц гAAV (например, согласно анализу векторного генома с помощью количественной ПЦР). В некоторых вариантах осуществления раскрытую в настоящем документе композицию вводят в локализованный участок тела. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что композиция, раскрытая в настоящем документе, приведет к ограниченному распространению по сосудам и системному воздействию. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, приводит к более высоким уровням последовательностей конструкций в глазу. В некоторых вариантах осуществления

раскрытая в данном документе композиция приводит к более низким, но поддающимся обнаружению уровням в большинстве других собранных тканей и жидкостей. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций обычно снижались в целом на шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций снижаются со временем в образцах крови, например, через один месяц после интраокулярного введения композиции, раскрытой в настоящем документе.

**[0465]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, собирают и/или оценивают соответствующие жидкости для биораспределения и выделения (например, кровь, сыворотку, мочу, слюну, мазки из носа и ушей и жидкость ЦСЖ). В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов собирают и/или оценивают ткани, не являющиеся мишенями. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что вариант капсида будет определять тропизм. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в настоящем документе, содержит вариант капсида, например, вариант капсида AAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что доставка композиции, описанной в настоящем документе, содержащей вариант капсида, например, одним и тем же путем введения, в том же составе частиц и/или в эквивалентных или меньших дозах частиц, не приведет к различиям в биораспределении и выделении паттернов.

**[0466]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, например, gAAV-CLRN1, вводится на уровне менее примерно  $2E12$  общих vg/улитка. В некоторых вариантах осуществления доза композиции, раскрытой в настоящем документе, зависит, например, от ограничений объема и концентрации частиц gAAV.

**[0467]** Напротив, в клинических испытаниях с использованием частиц gAAV было доставлено более  $1E14$  мкг/кг через системные пути введения, в некоторых случаях у участников младше 6 месяцев (AveXis 2019, включено в настоящий документ в полном объеме в качестве ссылки). Другие локальные доставки с относительно низкими дозами частиц gAAV не сообщали об обширном биораспределении за пределами области-мишени, например, по всему телу, или об обширном выносе частиц gAAV (выведение; обычно измерение концентрации базовой конструкции ДНК с помощью таких методов, как qPCR). Например, сообщалось о низком уровне распределения Luxturna® за пределами целевой области глаза (в частности, в зрительном нерве глаза, в который были введены частицы, перекресте зрительных нервов, селезенке и печени, а также спорадически в лимфатических узлах исследуемых животных) для двустороннего введения Luxturna® в дозе  $7,5E11$

vg/глаз. Аналогичным образом, в фазе 3 клинических испытаний частицы гAAV выделялись кратковременно и в небольших количествах со слезами у 45% участников; он был обнаружен, также на низких уровнях, в образцах сыворотки (но не цельной крови) 10% участников в дни сразу после субретинального введения Luxturna®, доставляемого двусторонне в дозе  $1,5 \times 10^{11}$  vg/глаз (см., например, Russell 2017; Spark Therapeutics 2017, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

**[0468]** В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в настоящем документе, включает оценку распределения последовательностей частиц гAAV в крови (например, сыворотке и цельной крови) с течением времени после одностороннего введения в улитку с использованием, например, проверенного метода количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления для оценки выделения у субъекта будут собираться дополнительные образцы (например, мазки из наружного слухового прохода, мазки из носа, слюна и моча). В некоторых вариантах осуществления образец берут у субъекта до тех пор, пока не будут получены по меньшей мере три последовательных отрицательных образца.

**[0469]** В некоторых вариантах осуществления белки, коррелирующие с потерей зрения, измеряют до, во время и/или после лечения композициями и/или способами, описанными в настоящем документе.

**[0470]** В некоторых вариантах осуществления измеряют иммуногенность по отношению к капсидам и/или частицам AAV. Иммуногенность капсидов и/или частиц AAV, доставленных в локализованные области, и в относительно низких дозах по сравнению с системными применениями, как правило, не приводила к специфическим образцам иммунных ответов; важно отметить, что ответы, наблюдаемые с помощью как гуморального, так и клеточно-опосредованного иммунологического мониторинга (например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [ИФА]/анализа нейтрализующих антител [NAb] и точечного иммуноферментного анализа [ELISPOT] соответственно), преимущественно не имели клинической корреляции для пути(-ей) введения (ROA), которые обеспечивают некоторую иммунологическую защиту (например, прямое введение в головной мозг).

**[0471]** В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, ожидается, что интраокулярный ROA обеспечит аналогичный уровень защиты. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, субъект будет получать короткий периоперационный курс иммуномодулирующего режима, например, системных пероральных кортикостероидов, в течение приблизительно 17 дней, начиная за 3 дня до введения композиций, раскрытых в настоящем документе, например, гAAV-CLRN1. В некоторых вариантах осуществления

иммуномодулирующий режим уменьшает воспаление, связанное с процедурой хирургического введения. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая схема также может дополнительно снижать вероятность иммунной реакции либо на капсид (например, AAV Anc80), либо на основную конструкцию (например, трансгенный продукт, например, белок CLRN1).

**[0472]** В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, дополнительно включает оценку гуморального иммунитета (например, ответов антител) в ответ на введение композиции, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления оценивается влияние ранее существовавшего иммунитета, определенного, например, по уровням NAb в сыворотке, на трансдукцию композиций, раскрытых в настоящем документе, при доставке через интраокулярный ROA. В некоторых вариантах осуществления ранее существовавшие уровни NAb не ингибируют трансдукцию частиц AAV, доставляемых интраокулярным путем введения. В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, дополнительно включает оценку сыворотки на потенциальные системные гуморальные ответы как на капсид AAV, так и/или на трансгенный продукт (например, белок). В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от оценки системных гуморальных ответов, может быть разработан интервал лечения для двустороннего интраокулярного введения композиции, раскрытой в настоящем документе, например, rAAV-CLRN1.

**[0473]** В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в настоящем документе, не приводит к цитотоксическим Т-клеточным ответам, например, на частицу AAV, капсид и/или продукт конструкции (например, базового трансгена) из частиц rAAV, доставляемых через локальный путь введения (ROA), например, внутриглазное введение. Например, в маркировке Luxturna® указано, что ни у одного субъекта не было клинически значимого ответа цитотоксических Т-клеток (Spark Therapeutics 2017, включено в настоящий документ в полном объеме в качестве ссылки); отдельные положительные результаты анализа ELISPOT на интерферон-гамма (IFN-gamma) были получены в ходе программы клинических исследований (см., например, Bennett 2012, полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки), но значимость этих изолированных результатов неизвестна, поскольку клинической воспалительной реакции не наблюдалось и в клинической программе не наблюдалось дозолимитирующей токсичности.

**[0474]** В определенных вариантах осуществления измеряют и собирают фармакокинетику любой из композиций или продуктов композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов композицию, раскрытую в данном документе, вводят местно.

В некоторых вариантах осуществления локальная доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, приводит к снижению вероятности возникновения любого одного или нескольких неблагоприятных нецелевых эффектов. В некоторых вариантах осуществления локальная доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, не приводит к каким-либо неблагоприятным нецелевым эффектам. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, за субъектом наблюдают путем мониторинга белка CLRN1 в сыворотке (например, с помощью электрохемилюминесцентного анализа), основных показателей жизнедеятельности, анализа мочи и/или клинической химии. В некоторых вариантах осуществления наблюдение за субъектом, которому вводят раскрытую в настоящем документе композицию, позволяет осуществлять раннее вмешательство и/или минимизировать любые нецелевые эффекты.

**[0475]** В некоторых вариантах осуществления после введения композиции, как описано в настоящем документе, сыворотку можно собрать и проанализировать для измерения белка CLRN1. В некоторых вариантах осуществления такие измерения могут проводиться до введения композиции (базовый уровень), на 2-й неделе после введения и ежемесячно в течение соответствующей продолжительности (например, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или более 5 лет). В некоторых вариантах осуществления белок CLRN1 не будет обнаруживаться в сыворотке индивидуума на исходном уровне или в любой момент времени после введения у индивидуумов, которые получили интраокулярную доставку либо носителя, либо низкой дозы частиц гAAV-CLRN1, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, получающего композицию, описанную в настоящем документе, с помощью способа, описанного в настоящем документе, при более высокой дозе гAAV-CLRN1, белок CLRN1 может обнаруживаться в сыворотке на уровнях либо ниже предела обнаружения или количественного определения, либо на уровнях ниже зарегистрированного биологически активного диапазона (от 11 нг/мл до 27 нг/мл [см., например, Genentech 2017, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки]).

**[0476]** В некоторых вариантах осуществления любого способа, раскрытого в настоящем документе, способ включает сбор и/или оценку сыворотки на наличие белка CLRN1 с использованием (например, электрохемилюминесцентного анализа, как описано в настоящем документе).

#### Способы получения

**[0477]** Системы AAV, как правило, хорошо известны в данной области техники (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); and Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4):699-708 (2012), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Способы создания и использования конструкций AAV описаны, например, в патенте США №№ 5139941, 4797368 и заявке на подачу PCT US 2019/060328, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**[0478]** Способы получения вирусных конструкций известны в данной области техники. 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; рекомбинантную конструкцию AAV, состоящую из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и кодирующей последовательности; и/или достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать рекомбинантную конструкцию AAV в капсидные белки AAV.

**[0479]** В некоторых вариантах осуществления компоненты для культивирования в клетке-хозяине для упаковки конструкции AAV в капсиде AAV могут быть введены в клетку-хозяин в транс. В качестве альтернативы, любой один или более компонентов (например, рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и/или хелперные функциональные элементы) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована в возможностью содержать один или более компонентов, с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления такая стабильная клетка-хозяин содержит такой(-ие) компонент(-ы) под контролем индуцибельного промотора. В некоторых вариантах осуществления такой(-ие) компонент(-ы) может(могут) находиться под контролем конститутивного промотора. В некоторых вариантах осуществления выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть получена стабильная клетка-хозяин, которая происходит из клеток НЕК293 (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), но которые содержат белки гер и/или сар под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть созданы специалистом в данной области техники с помощью обычных методов.

**[0480]** Рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функциональные элементы, необходимые для

продуцирования AAV по данному изобретению, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (конструкции). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами, и включает генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы (см., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая полностью включена в данный документ 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 № 5 478 745, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

**[0481]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с использованием метода тройной трансфекции (например, как описано в патенте США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантной конструкцией AAV (содержащей кодирующую последовательность), подлежащей упаковке в частицы AAV, конструкцией, обеспечивающей хелперную функцию для AAV, и конструкцией, обеспечивающей вспомогательную функцию. Конструкция, обеспечивающая хелперную функцию для AAV, кодирует последовательности, обеспечивающие «хелперную функцию для AAV» (т. е. гер и сар), которые функционируют *in trans* для продуктивной репликации и инкапсулирования AAV. В некоторых вариантах осуществления хелперная функциональная конструкция AAV поддерживает эффективное продуцирование конструкции AAV без образования каких-либо детектируемых частиц AAV дикого типа (то есть частиц AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры конструкций, подходящих для применения в настоящем раскрытии, включают rHLP19 (см., например, патент США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки) и конструкцию rPerbсарб (см., например, патент США № 6 156 303, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). Вспомогательная функциональная конструкция кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функций, не являющихся производными AAV, от которых зависит репликация AAV (то есть, «вспомогательные функциональные элементы»). Вспомогательные функции могут включать те функции, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, те части, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадийно-

специфическом сплайсинге мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии кэпа и сборке капсида AAV. Вирусные вспомогательные функциональные элементы могут быть приобретены из любого из известных хелперных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

**[0482]** Дополнительные способы создания и выделения вирусных конструкций AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-производитель временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В другой системе пакующую линию клеток, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления AAV — хелперные функциональные элементы (т. е. аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимеразы вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

**[0483]** В некоторых вариантах осуществления определяют титры вирусных конструкций после очистки. В некоторых вариантах осуществления титр определяют с помощью количественной ПЦР. В определенных вариантах осуществления для определения уровня конструкции используют зонд TaqMan, специфичный для конструкции. В определенных вариантах осуществления зонд TaqMan представлен SEQ ID NO: 65, а праймеры для прямой и обратной амплификации представлены SEQ ID NO: 66 и 67, соответственно.

**[0484] Иллюстративный зонд TaqMan для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 65)**

/56-FAM/TAATTCCAA/ZEN/CCAGCAGAGTCAGGGC/3IABkFQ/

**[0485] Иллюстративный праймер для прямой кПЦР для количественного**

**определения конструкций (SEQ ID NO: 66)**

GATACAGCTAGAGTCCTGATTGC

**[0486] Иллюстративный праймер для обратной кПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 67)**

GATCTGCCAAGTACCTCACTATG

**[0487]** Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция по 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 данный документ посредством ссылки. Как правило, для доставки описанной в данном документе кодирующей последовательности можно использовать любую частицу AAV. Однако серотипы имеют разные тропизмы, например, они преимущественно инфицируют разные ткани. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV представляет собой самокомплементарную конструкцию AAV.

**[0488]** В настоящем изобретении предложены, среди прочего, способы изготовления 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 использоваться в качестве реципиента хелперной конструкции AAV, минигенной плазмиды AAV, вспомогательной функциональной конструкции и/или другого ДНК-переносчика, связанного с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, используемый в данном документе термин «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 или по комплементарной последовательности геномной или общей ДНК с исходной родительской клеткой вследствие природных, случайных или умышленных мутаций.

**[0489]** Дополнительные способы получения и выделения частиц AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США №

7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-производитель временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В другой системе паковую линию клеток, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, частицы AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления частиц AAV — хелперные функциональные элементы (т. е. аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимеразы вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

**[0490]** В еще одной системе кодирующая последовательность, фланкированная ITR, и гены гер/сар вводятся в клетки-хозяева насекомых путем инфицирования конструкциями на основе бакуловируса. Такие системы продукции известны в данной области техники (см. в целом, например, Zhang et al., 2009, Human Gene Therapy 20:922-929, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Способы получения и использования этих и других систем продукции AAV также описаны в патентах США № 5 139 941; 5 741 683; 6 057 152; 6 204 059; 6 268 213; 6 491 907; 6 660 514; 6 951 753; 7 094 604; 7 172 893; 7 201 898; 7 229 823; и 7 439 065, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

## **ПРИМЕРЫ**

**[0491]** Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в данном документе.

[0492] Считается, что специалист в данной области техники сможет, используя предшествующее описание и следующие примеры, а также то, что известно в данной области техники, создать и использовать технологии по настоящему раскрытию.

### **Пример 1. Конструирование вирусных конструкций**

[0493] В этом примере представлено описание создания вирусной конструкции, как описано в данном документе. Рекомбинантную частицу AAV (гAAV) получали путем трансфекции методом, в котором не применяются аденовирусы, который использовали как описано в публикации Xiao et al. *J Virol.* 73(5):3994-4003, 1999, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Цис-плазмиды с ITR AAV, транс-плазмиду с генами AAV Rep и Cap и хелперную плазмиду с основной областью из генома аденовируса котрансфицировали в клетки HEK293. Конструкция гAAV экспрессировала кларин 1 человека в соответствии со стратегией применения одиночной конструкции с использованием описанных конструкций. Капсид AAV Anc80 был получен для инкапсуляции уникальной конструкции, кодирующей белок кларин 1 гAAV.

[0494] Специалистам в данной области техники будет понятно, что подобные конструкции могут быть получены в соответствии с этим примером. Например, могут быть созданы конструкции гAAV, которые экспрессируют кларин 1 млекопитающих, приматов или человека в рамках стратегий с применением одной, двух или нескольких конструкций. Серотипы AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 могут быть подготовлены для инкапсуляции четырех наборов конструкций кларина 1 для тестирования (i) стратегии конкатемеризации-сплайсинга, (ii) стратегии гибридной интронно-гомологичной рекомбинации-трансплайсинга, (iii) стратегии экзонной гомологичной рекомбинации, как обобщено описано в работе Pryadkina et al., *Meth. Clin. Devel.* 2:15009, 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки, и (iv) стратегии применения одиночной конструкции.

### **Пример 2. Получение и очистка вируса**

[0495] Двойные векторы AAV были получены путем временной трансфекции клеток HEK293, выращенных на многоуровневых клеточных фабриках. Клетки котрансдуцировали хелперными плазмидами для продукции вируса, кодирующего капсидные белки серотипа 6. Очистку клеточных лизатов проводили ультрацентрифугированием в градиенте плотности с йодиксанолом, после чего следовала вторая стадия очистки и концентрирования с помощью аффинной хроматографии FPLC (см., например, Asai et al. 2015) *Nat. Neurosci.* 18 1584-1593; и Tereshchenko et al. 2014

Neurobiol. Dis. 65 35-42; каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Для метода транс-сплайсинга 5'-вектор достиг концентрации  $-2,8 \times 10^8$  трансдуцирующих единиц/мкл. 3'-вектор достигал  $\sim 1,4 \times 10^8$  трансдуцирующих единиц/мкл. При гибридном подходе оба вируса очищали одновременно в одних и тех же растворах, достигая несколько более высоких титров вируса.

### **Пример 3. Создание и очистка вирусных частиц**

[0496] Этот пример обеспечивает описание очистки вирусной конструкции. Рекомбинантный AAV (rAAV) получали с использованием стандартного протокола тройной трансфекции и очищали (например, с помощью двух последовательных градиентов плотности хлорида цезия (CsCl), как описано в Pryadkina et al., Mol. Ther. 2:15009, 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В конце второго центрифугирования 11 фракций по 500 мкл извлекали из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищали диализом в 1x ФСБ. Фракции анализировали с помощью дот-блоттинга, чтобы определить те, которые содержат геномы rAAV. Количество вирусных геномов (вг) каждого препарата определяли методом а количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома конструкции на основе AAV (см., например, Bartoli et al. Gene. Ther. 13:20-28, 2006, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Специалистам в данной области техники будет понятно, что в соответствии с этим примером можно осуществлять альтернативные способы получения и/или очистки. Например, частицы rAAV могут быть очищены с использованием различных методов колоночной хроматографии, известных в данной области техники, и/или вирусные геномы могут быть количественно определены с использованием альтернативных наборов праймеров.

### **Пример 4. Составление вирусных частиц**

[0497] Этот пример относится к получению композиций, содержащих частицы rAAV и физиологически приемлемый раствор. rAAV получали и очищали до титра  $4,45^{12}$  вг/мл, а затем готовили в разведениях  $6 \times 10^4$ ,  $1,3 \times 10^5$ ,  $1,8 \times 10^5$ ,  $4,5 \times 10^9$  и  $1,3 \times 10^{10}$  вг/мл в физиологически приемлемом растворе (например, коммерчески доступный 1xФСБ с плюрониловой кислотой F68, приготовленный до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия, 1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001% плюрониловой кислоты F68).

[0498] Специалистам в данной области техники будет понятно, что альтернативные

составы могут быть получены в соответствии с этим примером. Например, частицы гAAV могут быть очищены до альтернативного титра, приготовлены в альтернативных разведениях и суспендированы в альтернативных подходящих растворах. Например, гAAV может быть получен и очищен до количественного титра и приготовлен в соответствующих разведениях в физиологически приемлемом растворе (например, искусственная перилимфа, содержащая NaCl, 120 мМ; KCl, 3,5 мМ; CaCl<sub>2</sub>, 1,5 мМ; глюкозу, 5,5 мМ; HEPES, 20 мМ, который титруют с помощью NaOH для доведения pH до 7,5 (общая концентрация Na<sup>+</sup> 130 мМ), как описано в Chen et al., J Controlled Rel. 110:1-19, 2005, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

### **Пример 5. Описание устройства для подходящей доставки композиций во внутреннее ухо**

**[0499]** 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 мембрану круглого окна (RWM). Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий процедуру доставки, может войти в полость среднего уха через наружный слуховой проход и привести в контакт конец микрокатетера с RWM. Дистальный конец микрокатетера может включать по меньшей мере одну микроиглу диаметром от около 10 микрон до около 1000 микрон, которая создает отверстия в RWM, достаточные для того, чтобы позволить конструировать частицы гAAV, как описано (например, содержащие конструкцию гAAV по настоящему изобретению) для проникновения в улитковую перилимфу барабанной лестницы со скоростью, которая не повреждает внутреннее ухо (например, физиологически приемлемая скорость, например, скорость от приблизительно 30 мкл/мин до приблизительно 90 мкл/мин), но достаточно мала, чтобы вылечить без хирургического вмешательства. В оставшуюся часть микрокатетера, проксимальную к микроиглам (иглам), загружают состав гAAV/искусственной перилимфы с определенным титром (например, приблизительно от  $1 \times 10^{12}$  до  $5 \times 10^{13}$  вг/мл). Проксимальный конец микрокатетера подсоединен к микроманипулятору, который позволяет проводить точные инфузии небольшого объема от приблизительно 30 мкл до приблизительно 100 мкл.

**[0500]** В настоящем примере также описывается, что композиция, содержащая частицы гAAV, доставляется в улитку субъекта с использованием специального микрокатетера, предназначенного для последовательного и безопасного проникновения через мембрану круглого окна (RWM), описанного в "Devices, systems, and methods for delivering fluid to the

inner ear,” см., например, WO 2021/242926, содержание которой включено в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

### **Пример 6. Описание устройства для подходящей доставки композиций в глаз**

**[0501]** Этот пример также относится к устройству, подходящему для доставки частиц гAAV в глаз. Композицию, содержащую частицы гAAV, доставляют в глаз субъекта с помощью специального микрокатетера, предназначенного для последовательного и безопасного проникновения в сетчатку. Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий процедуру доставки, может войти в глаз и привести в контакт конец микрокатетера с сетчаткой. Дистальный конец микрокатетера может включать по меньшей мере одну микроиглу диаметром от около 10 микрон до около 1000 микрон, которая создает отверстия в сетчатке, достаточные для того, чтобы позволить конструировать частицы гAAV, как описано (например, содержащие конструкцию гAAV по настоящему изобретению) для проникновения в глаз со скоростью, которая не повреждает внутреннее ухо (например, физиологически приемлемая скорость, например, скорость от приблизительно 30 мкл/мин до приблизительно 90 мкл/мин), но достаточно мала, чтобы вылечить без хирургического вмешательства. В оставшуюся часть микрокатетера, проксимальную к микроиглам (иглам), загружают состав гAAV/искусственной перилимфы с определенным титром (например, приблизительно от  $1 \times 10^{12}$  до  $5 \times 10^{13}$  вг/мл). Проксимальный конец микрокатетера подсоединен к микроманипулятору, который позволяет проводить точные инфузии небольшого объема от приблизительно 30 мкл до приблизительно 100 мкл.

**[0502]** Среди прочего, в настоящем примере описывается, что интраоперационная оптическая когерентная томография (ОКТ) с интегрированным микроскопом используется для создания небольшого предварительного пузырька перед инъекцией вируса, чтобы избежать суб-RPE или супрахориальной инъекции. Сначала гиалоидную мембрану окрашивают и удаляют с помощью тонкой петли и приподнимают с помощью мягкого силиконового наконечника. Затем в субретинальное пространство вводят сбалансированный солевой раствор и проводят ОКТ-сканирование для проверки фовеолярного истончения. После того, как пузырь сделан, вводят воретиген с помощью канюли без двойного отверстия 25-го калибра. После этого необходимо тщательно контролировать центральную ямку, чтобы избежать чрезмерного растяжения и образования макулярного отверстия. Вдавление склеры можно использовать для исключения периферических разрывов. Наконец, для очистки от вируса используется обмен воздух-жидкость. См., например, “OCT – Assisted Delivery of Luxturna” by Ninel Z Gregori and Janet

Louise David, <https://www.aao.org/clinical-video/oct-assisted-delivery-of-luxturna> (19 июля 2018 г.), содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[0503]** В качестве другого примера можно использовать систему субретинальной доставки Orbit™ (Orbit SDS) (Gyroscope Therapeutics) для введения или введения в глаз описанных композиций (см. «Инструкции по применению системы субретинальной доставки Orbit, июнь 2020 г.», <https://www.orbitsds.com/wp-content/uploads/2020/08/AW1009028-Rev.-D-US-IFU-No-Cut-Lines.pdf>, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Подводя итог, сначала подготавливают глаз для размещения устройства. Затем с помощью лезвия делается склеральный разрез, чтобы обнажить сосудистую оболочку. Разрез может быть около 3 мм в длину рядом с сосудистой оболочкой. Затем помещают устройство для продвижения иглы, которая вводит композицию в глаз. Гибкая канюля вводится в глаз с помощью пинцета. Перед введением сдвиньте корпус субретинального устройства доставки к глазу, чтобы обеспечить дополнительную слабинку и сохранить тангенциальный путь к кривизне глаза. Захватив зубчатыми щипцами центр задней губы склеротомии и оттянув ее от глаза, введите гибкую канюлю в склеротомию, продвигаясь до первой штриховой метки, расположенной в 5 мм от дистального конца, затем останавливаясь.

### **Пример 7. Экспрессия белков CLRN1, полученных из клеточных линий**

**[0504]** Этот пример относится к трансдукции и/или трансфекции иллюстративных конструкций и экспрессии иллюстративных белков, описанных в настоящем документе.

**[0505]** Линии клеток (*например*, HEK293FT) трансдуцировали двумя типами типичных частиц rAAV Anc80-CLRN1 (частицы rAAV Anc80-CLRN1wt и частицы rAAV Anc80-CLRN1 с оптимизированным кодоном), как описано в настоящем документе. Для случаев трансфекции клетки HEK293FT высевали в течение ночи в количестве  $1,5 \times 10^5$  клеток/лунку в формате 24-луночного планшета с объемом культуры 500 мкл. Приблизительно 800 нг конструкций CLRN1 (как описано в примере 1) трансфицировали в клетки с использованием реагента для трансфекции jetprime (Polyplus-transfection® SA). Для событий трансдукции клетки HEK293FT высевали в течение 6 часов при  $4 \times 10^4$  клеток/лунку в формате 96-луночного планшета с объемом культуры 50 мкл в присутствии 2 мкМ этопозида (Fisher Scientific 34120525MG), иллюстративные частицы rAAV Anc80-CLRN1 (как описано в примере 1) добавляли в среду в количестве  $6,7 \times 10^4$ ,  $1,3 \times 10^5$  или  $2,3 \times 10^5$  соответственно (с обработкой PNGase F, как указано). Для трансдуцированных клеток супернатант собирали через 72 часа после обработки каждого образца. Для анализа

экспрессии белка 30 мкл образцов загружали в отдельные лунки в 4-12% белковом геле Bis-Tris и проводили стандартные процедуры вестерн-блоттинга, известные в данной области техники. Характеры исчерченности определяли с использованием флуоресцентного ридера с тестируемым антителом против CLRN1 (поликлональное Ab CLRN1 Thermofisher AB2042) в качестве первичного зонда для обнаружения и антителом IgG человека в качестве вторичного зонда для обнаружения (см. **фиг. 17**). Показаны полосы гликозилированной изоформы А CLRN1 и дегликозилированной изоформы А CLRN1 (см. **фиг. 17**)

### **Пример 8. Демонстрация выработки белка CLRN1 ex-vivo**

**[0506]** Этот пример относится к введению и анализу экспрессии конструкций гAAV, экспрессирующих белок CLRN1, в эксплантатах улитки млекопитающих, выращенных *in vitro* или *ex-vivo*. Модели культур эксплантатов улитки могут обеспечить надежную экспериментальную систему для имитации морфологии и молекулярных характеристик сенсорных волосковых клеток и несенсорных поддерживающих клеток улитки для изучения трансдукции и экспрессии частиц гAAV в пределах внутренней клеточной среды, обнаруженной *in-vivo*.

**[0507]** В настоящем документе описаны *ex-vivo* оценки экспрессии белка CLRN1 в эксплантатах улитки новорожденных мышей дикого типа, трансдуцированных частицами гAAV (*например*, гAAV Anc80), содержащими конструкции гAAV-CLRN1 (как описано в примере 1). В этих экспериментах Кортиев орган вырезали и помещали на покровные стекла с последующей инкубацией в течение трех-четырех дней либо с носителем, либо с рядом доз частиц гAAV — например, частицы гAAV Anc80-CLRN1 трансдуцировали при  $1,0 \times 10^{10}$  vg/эксплантат или  $3,0 \times 10^{10}$  vg/эксплантат.

**[0508]** Экспланты собирали и лизировали для анализа экспрессии рибонуклеиновой кислоты (РНК) с использованием количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR) с праймерами-зондами Taqman для GAPDH (контроль домашнего хозяйства) и для нуклеотидов, кодирующих белок CLRN1 (продукты мРНК, кодирующие CLRN1) (**фиг. 18A**).

**[0509]** РНК CLRN1 была обнаружена в эксплантах, получавших частицы гAAV Anc80-CLRN1, но не в имитаторах (**фиг. 18A**). Эти данные свидетельствуют о том, что введение частиц гAAV Anc80-CLRN1, содержащих конструкции, кодирующие белки CLRN1, в улитку мышей дикого типа *ex-vivo* приводит к экспрессии РНК CLRN1 человека из трансдуцированных клеток. На **фиг. 18B** показано флуоресцентное изображение, изображающее экспрессию белка CLRN1 в эксплантатах.

**ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0510]** Вариант осуществления 1. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует белок кларин 1.

**[0511]** Вариант осуществления 2. Конструкция по варианту осуществления 1, в которой кодирующая последовательность представляет собой ген CLRN1.

**[0512]** Вариант осуществления 3. Конструкция по варианту осуществления 2, в которой ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 примата.

**[0513]** Вариант осуществления 4. Конструкция по варианту осуществления 2 или 3, в которой ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 человека.

**[0514]** Вариант осуществления 5. Конструкция по варианту осуществления 4, в которой ген CLRN1 человека содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19.

**[0515]** Вариант осуществления 6. Конструкция по варианту осуществления 4 или 5, в которой ген CLRN1 человека содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1.

**[0516]** Вариант осуществления 7. Конструкция по варианту осуществления 4 или 5, в которой ген CLRN1 человека содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 19.

**[0517]** Вариант осуществления 8. Конструкция по варианту осуществления 1, в которой белок кларин 1 представляет собой белок кларин 1 примата.

**[0518]** Вариант осуществления 9. Конструкция по варианту осуществления 1 или 8, в которой белок кларин 1 представляет собой белок кларин 1 человека.

**[0519]** Вариант осуществления 10. Конструкция по варианту осуществления 9, в которой белок кларин 1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10.

**[0520]** Вариант осуществления 11. Конструкция по любому из пп. 1-10, в которой промотор представляет собой индуцируемый промотор, конститутивный промотор или тканеспецифический промотор.

**[0521]** Вариант осуществления 12. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-11, в которой промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток внутреннего уха.

**[0522]** Вариант осуществления 13. Конструкция по варианту осуществления 12, в

которой промотор, специфичный для клеток внутреннего уха, представляет собой промотор GJB2, промотор GJB6, промотор CLRN1, 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 NOTCH1, промотор JAG1, промотор CDKN1A, промотор CDKN1B, промотор SOX10, промотор P75, промотор CD44, промотор HEY2, промотор LFNG или промотор S100b.

**[0523]** Вариант осуществления 14. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1- 11, в которой промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток глаза.

**[0524]** Вариант осуществления 15. Конструкция по варианту осуществления 14, в которой промотор, специфичный для клетки глаза, представляет собой промотор CLRN1, промотор RPE65, промотор RLBP1, промотор VMD2, промотор IRBP, промотор GNAT2, промотор PR1.7, промотор PR2.1, промотор HB569, промотор CAR, промотор GRK1, промотор RK, промотор B-PDE, промотор GRM6, промотор Nefh, промотор Tuh1, промотор SYN, промотор GFAP или промотор другого опсина или родопсина.

**[0525]** Вариант осуществления 16. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1- 15, в которой промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV или промотор CB7.

**[0526]** Вариант осуществления 17. Конструкция по варианту осуществления 12 или 14, причем промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 23.

**[0527]** Вариант осуществления 18. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-17, дополнительно содержащая последовательность полиаденилирования.

**[0528]** Вариант осуществления 19. Конструкция по любому из вариантов осуществления 18, в которой последовательность полиаденилирования представляет собой ATAAA, AGTAAA, CATAAA, TATAAA, GATAAA, ACTAAA, AATATA, AAGAAA, AATAAT, AAAAAA, AATGAA, AATCAA, AACAAA, AATCAA, AATAAC, AATAGA, AATTAA или AATAAG.

**[0529]** Вариант осуществления 20. Конструкция по варианту осуществления 18, в которой последовательность полиаденилирования содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 45.

**[0530]** Вариант осуществления 21. Конструкция по варианту осуществления 18, в которой последовательность полиаденилирования содержит последовательность в

соответствии с SEQ ID NO: 44.

**[0531]** Вариант осуществления 22. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-21, дополнительно содержащая два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, причем два ITR AAV фланкируют кодирующую последовательность и промотор.

**[0532]** Вариант осуществления 23. Конструкция по варианту осуществления 22, в которой два ITR AAV являются ITR AAV2 или получены из них.

**[0533]** Вариант осуществления 24. Конструкция по варианту осуществления 22, в которой два ITR AAV содержат:

5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 21, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 22.

**[0534]** Вариант осуществления 25. Конструкция по варианту осуществления 1, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 64.

**[0535]** Вариант осуществления 26. Конструкция по варианту осуществления 1, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 68.

**[0536]** Вариант осуществления 27. Частица AAV, содержащая конструкцию по любому из вариантов осуществления 1-26.

**[0537]** Вариант осуществления 28. Частица AAV по варианту осуществления 27, дополнительно содержащая капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой капсид Anc80 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или AAV, или получен из них.

**[0538]** Вариант осуществления 29. Частица AAV по варианту осуществления 28, в которой капсид AAV представляет собой капсид Anc80 AAV.

**[0539]** Вариант осуществления 30. Композиция, содержащая конструкцию по любому из вариантов осуществления 1-26.

**[0540]** Вариант осуществления 31. Композиция, содержащая частицу AAV по любому из вариантов осуществления 27-29.

**[0541]** Вариант осуществления 32. Композиция по варианту осуществления 30 или 31, причем композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

**[0542]** Вариант осуществления 33. Композиция по варианту осуществления 32, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

**[0543]** Вариант осуществления 34. Клетка *ex vivo*, содержащая композицию по

любому из вариантов осуществления 30 или 31.

**[0544]** Вариант осуществления 35. Способ, включающий трансфекцию клетки *ex vivo*:

(i) конструкцией по любому из вариантов осуществления 22-26; и

(ii) одну или более хелперных плазмид, совместно содержащих ген Rep AAV, ген Cap AAV, ген VA AAV, ген E2a AAV и ген E4 AAV.

**[0545]** Вариант осуществления 36. Способ, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 во внутреннее ухо субъекта.

**[0546]** Вариант осуществления 37. Способ лечения, включающий

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 во внутреннее ухо субъекта.

**[0547]** Вариант осуществления 38. Способ лечения синдрома Ашера типа III, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 во внутреннее ухо субъекта.

**[0548]** Вариант осуществления 39. Способ лечения потери слуха, включающий

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 во внутреннее ухо субъекта.

**[0549]** Вариант осуществления 40. Способ лечения глухоты, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 во внутреннее ухо субъекта.

**[0550]** Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 36-40, в котором композицию по варианту осуществления 32 или 33 вводят в улитку субъекта.

**[0551]** Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 36-41, в котором композицию по варианту осуществления 32 или 33 вводят посредством инъекции через мембрану круглого окна.

**[0552]** Вариант осуществления 43. Способ по любому из вариантов осуществления 36-42, дополнительно включающий измерение уровня слуха субъекта.

**[0553]** Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 43, в котором уровень слуха измеряют путем выполнения теста акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR).

**[0554]** Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 43 или 44, дополнительно включающий сравнение уровня слуха субъекта с эталонным уровнем слуха.

**[0555]** Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 45, в котором эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень слуха.

**[0556]** Вариант осуществления 47. Способ по варианту осуществления 45, в котором уровень слуха субъекта измеряют после введения композиции по варианту осуществления 32 или 33, а эталонный уровень слуха представляет собой уровень слуха субъекта, который был измерен до введения композиции по варианту осуществления 32 или 33.

**[0557]** Вариант осуществления 48. Способ по любому из вариантов осуществления 36-47, дополнительно включающий измерение уровня белка кларина 1 у субъекта.

**[0558]** Вариант осуществления 49. Способ по варианту осуществления 48, в котором уровень белка кларина 1 измеряют во внутреннем ухе субъекта.

**[0559]** Вариант осуществления 50. Способ по варианту осуществления 48 или 49, в котором уровень белка кларина 1 измеряют в улитке субъекта.

**[0560]** 51. Способ по любому из вариантов осуществления 48-50, дополнительно включающий сравнение уровня белка кларина 1 у субъекта с эталонным уровнем белка кларина 1.

**[0561]** Вариант осуществления 52. Способ по варианту осуществления 49, в котором эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень белка кларина 1.

**[0562]** Вариант осуществления 53. Способ по варианту осуществления 45, в котором уровень белка кларина 1 у субъекта измеряют после введения композиции по варианту осуществления 32 или 33, а эталонный уровень белка кларина 1 представляет собой уровень белка кларина 1 у субъекта, который был измерен до введения композиции по варианту осуществления 32 или 33.

**[0563]** Вариант осуществления 54. Способ, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 в глаз субъекта.

**[0564]** Вариант осуществления 55. Способ лечения, включающий

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по

любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 в глаз субъекта.

**[0565]** Вариант осуществления 56. Способ лечения синдрома Ашера типа III, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 в глаз субъекта.

**[0566]** Вариант осуществления 57. Способ лечения потери зрения, включающий введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 в глаз субъекта.

**[0567]** Вариант осуществления 58. Способ лечения пигментной дистрофии сетчатки, включающий:

введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по варианту осуществления 32 или 33 в глаз субъекта.

**[0568]** Вариант осуществления 59. Способ по любому из вариантов осуществления 54-59, в котором композицию по варианту осуществления 32 или 33 вводят посредством инъекции через глаз.

**[0569]** Вариант осуществления 60. Способ по любому из вариантов осуществления 54-59, дополнительно включающий измерение уровня зрения субъекта.

**[0570]** Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 60, в котором уровень слуха измеряют путем выполнения проверки остроты зрения.

**[0571]** Вариант осуществления 62. Способ по варианту осуществления 60 или 61, дополнительно включающий сравнение уровня зрения субъекта с эталонным уровнем зрения.

**[0572]** Вариант осуществления 63. Способ по варианту осуществления 62, в котором эталонный уровень зрения представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень зрения.

**[0573]** Вариант осуществления 64. Способ по варианту осуществления 62, в котором уровень зрения субъекта измеряют после введения композиции по варианту осуществления 32 или 33, а эталонный уровень зрения представляет собой уровень зрения субъекта, который был измерен до введения композиции по варианту осуществления 32 или 33.

**[0574]** Вариант осуществления 65. Способ по любому из вариантов осуществления 54-64, дополнительно включающий измерение уровня белка кларина 1 у субъекта.

- [0575] Вариант осуществления 66. Способ по варианту осуществления 65, в котором уровень белка кларина 1 измеряют в глазу субъекта.
- [0576] Вариант осуществления 67. Способ по любому из вариантов осуществления 65 или 66, дополнительно включающий сравнение уровня белка кларина 1 у субъекта с эталонным уровнем белка кларина 1.
- [0577] Вариант осуществления 68. Способ по варианту осуществления 67, в котором эталонный уровень зрения представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень белка кларина 1.
- [0578] Вариант осуществления 69. Способ по варианту осуществления 68, в котором уровень белка кларина 1 у субъекта измеряют после введения композиции по варианту осуществления 32 или 33, а эталонный уровень белка кларина 1 представляет собой уровень белка кларина 1 у субъекта, который был измерен до введения композиции по варианту осуществления 32 или 33.
- [0579] Вариант осуществления 70. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 для лечения потери слуха у субъекта, страдающего или подверженного риску потери слуха.
- [0580] Вариант осуществления 71. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 в производстве лекарственного средства для лечения потери слуха.
- [0581] Вариант осуществления 72. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 для лечения потери зрения у субъекта, страдающего или подверженного риску потери зрения.
- [0582] Вариант осуществления 73. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 в производстве лекарственного средства для лечения потери зрения.
- [0583] Вариант осуществления 74. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 для лечения синдрома Ашера типа III у субъекта, страдающего или подверженного риску синдрома Ашера типа III.
- [0584] Вариант осуществления 75. Применение конструкции по любому из

вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 для лечения пигментной дистрофии сетчатки у субъекта, страдающего или подверженного риску пигментной дистрофии сетчатки.

**[0585]** Вариант осуществления 76. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 в производстве лекарственного средства для лечения синдром Ашера типа III.

**[0586]** Вариант осуществления 77. Применение конструкции по любому из вариантов осуществления 1-26, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиции по любому из вариантов осуществления 30-33 в производстве лекарственного средства для лечения пигментной дистрофии сетчатки.

**[0587]** Вариант осуществления 78. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-26, частица AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения в качестве лекарственного средства.

**[0588]** Вариант осуществления 79. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-26, частица AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения при лечении потери слуха.

**[0589]** Вариант осуществления 80. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-26, частица AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения при лечении потери зрения.

**[0590]** Вариант осуществления 81. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-26, частица AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения при лечении синдрома Ашера типа III.

**[0591]** Вариант осуществления 82. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-26, частица AAV по любому из вариантов осуществления 27-29 или композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения при лечении пигментной дистрофии сетчатки.

**[0592]** Вариант осуществления 83. Набор, содержащий композицию по любому из вариантов осуществления 30-33.

**[0593]** Вариант осуществления 84. Набор по варианту осуществления 83, в котором

композиция предварительно загружена в устройство.

**[0594]** Вариант осуществления 85. Набор по варианту осуществления 84, в котором устройство представляет собой микрокатетер.

**[0595]** Вариант осуществления 86. Набор по варианту осуществления 85, в котором микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и контактировать концом микрокатетера с RWM.

**[0596]** Вариант осуществления 87. Набор по варианту осуществления 85 или 86, в котором дистальный конец микрокатетера состоит из по меньшей мере одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

**[0597]** Вариант осуществления 88. Набор по любому из вариантов осуществления 83-87, дополнительно содержащий устройство.

**[0598]** Вариант осуществления 89. Набор по варианту осуществления 88, в котором устройство представляет собой устройство, описанное на фиг. 21-24, или устройство, как описано в WO 2021/242926.

**[0599]** Вариант осуществления 90. Набор по варианту осуществления 89, в котором устройство содержит иглу, имеющую изогнутую часть и скошенный под углом кончик.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует белок кларин 1.
2. Конструкция по п. 1, в которой кодирующая последовательность представляет собой ген CLRN1.
3. Конструкция по п. 2, в которой ген CLRN1 представляет собой ген CLRN1 человека.
4. Конструкция по любому из пп. 1-3, в которой белок кларин 1 представляет собой белок кларин 1 человека.
5. Конструкция по любому из пп. 1-4, в которой промотор представляет собой индуцируемый промотор, конститутивный промотор или тканеспецифический промотор.
6. Конструкция по любому из пп. 1-5, в которой промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток внутреннего уха, при этом промотор, специфичный для клеток внутреннего уха, необязательно представляет собой промотор GJB2, промотор GJB6, промотор CLRN1, 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 NOTCH1, промотор JAG1, промотор CDKN1A, промотор CDKN1B, промотор SOX10, промотор P75, промотор CD44, промотор HEY2, промотор LFNG или промотор S100b.
7. Конструкция по любому из пп. 1-5, в которой промотор представляет собой промотор, специфичный для клетки глаза, при этом промотор, специфичный для клетки глаза, необязательно представляет собой промотор CLRN1, промотор RPE65, промотор RLBP1, промотор VMD2, промотор IRBP, промотор GNAT2, промотор PR1.7, промотор PR2.1, промотор HB569, промотор CAR, промотор GRK1, промотор RK, промотор B-PDE, промотор GRM6, промотор Nefh, промотор Tyh1, промотор SYN, промотор GFAP или другой промотор опсина или родопсина.
8. Конструкция по любому из пп. 1-5, в которой промотор представляет собой

промотор СAG, промотор СВА, промотор СМV или промотор СВ7.

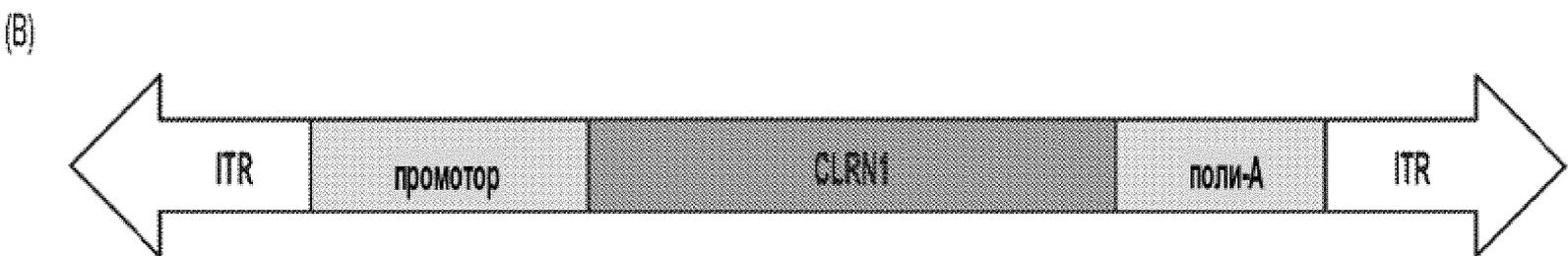
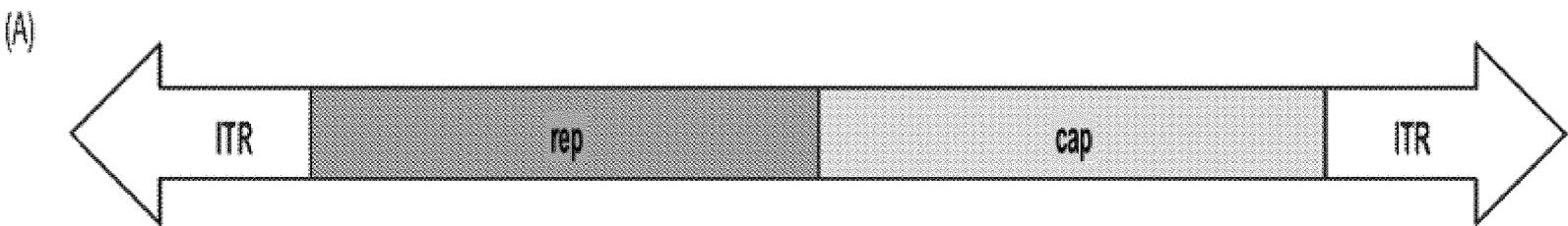
9. Конструкция по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащая последовательность полиаденилирования.
10. Конструкция по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, причем два ITR AAV фланкируют кодирующую последовательность и промотор.
11. Конструкция по п. 1, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 64 или 68.
12. Частица AAV, содержащая конструкцию по любому из пп. 1-11.
13. Частица AAV по п. 12, дополнительно содержащая капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой капсид AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или Anc80 AAV, или получен из них.
14. Композиция, содержащая конструкцию по любому из пп. 1-11 или частицу AAV по п. 12 или п. 13.
15. Композиция по п. 14, причем композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
16. Клетка *ex vivo*, содержащая композицию по любому из пп. 14 или 15.
17. Способ, включающий трансфекцию клетки *ex vivo*:
  - (i) конструкцией по п. 10 или п. 11; и
  - (ii) одну или более хелперных плазмид, совместно содержащих ген Rep AAV, ген Cap AAV, ген VA AAV, ген E2a AAV и ген E4 AAV.
18. Способ, включающий:

введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13 или композиции по п. 14 или п. 15 во внутреннее ухо или глаз субъекта.

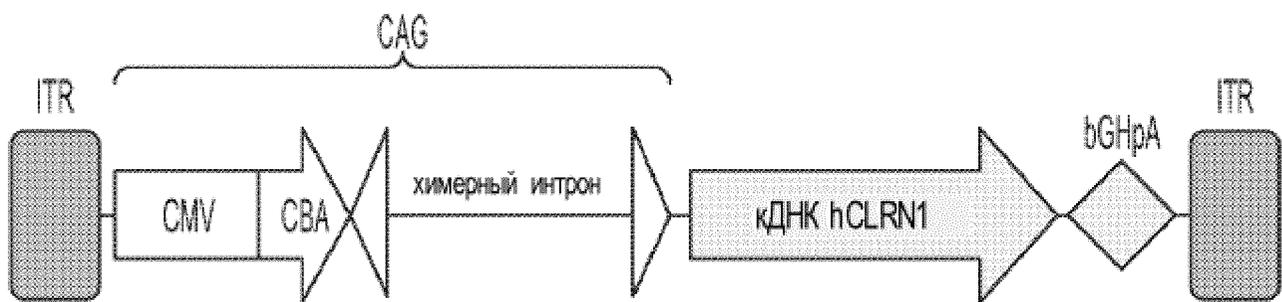
19. Способ лечения, включающий введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13 или композиции по п. 14 или п. 15 во внутреннее ухо или глаз субъекта.
20. Способ лечения синдрома Ашера типа III, включающий: введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13 или композиции по п. 14 или п. 15 во внутреннее ухо или глаз субъекта.
21. Способ лечения потери слуха, включающий введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 во внутреннее ухо субъекта.
22. Способ лечения глухоты, включающий: введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 во внутреннее ухо субъекта.
23. Способ лечения потери зрения, включающий введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в глаз субъекта.
24. Способ лечения пигментной дистрофии сетчатки, включающий: введение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в глаз субъекта.
25. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 для лечения потери слуха у субъекта, страдающего или подверженного риску потери слуха.
26. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в производстве лекарственного средства для лечения потери слуха.
27. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или 15 для лечения потери зрения у субъекта, страдающего или подверженного риску потери зрения.

28. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в производстве лекарственного средства для лечения потери зрения.
29. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или 15 для лечения синдрома Ашера типа III у субъекта, страдающего или подверженного риску синдрома Ашера типа III.
30. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в производстве лекарственного средства для лечения синдрома Ашера типа III.
31. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или 15 для лечения пигментной дистрофии сетчатки у субъекта, страдающего или подверженного риску пигментной дистрофии сетчатки.
32. Применение конструкции по любому из пп. 1-11, частицы AAV по п. п. 12 или п. 13, или композиции по п. 14 или п. 15 в производстве лекарственного средства для лечения пигментной дистрофии сетчатки.
33. Конструкция по любому из пп. 1-11, частица AAV по п. 12 или п. 13, или композиция по п. 14 или п. 15 для применения в качестве лекарственного средства.
34. Конструкция по любому из пп. 1-11, частица AAV по п. 12 или п. 13, или композиция по п. 14 или п. 15 для применения при лечении потери слуха.
35. Конструкция по любому из пп. 1-11, частица AAV по п. 12 или п. 13, или композиция по п. 14 или п. 15 для применения при лечении потери зрения.
36. Конструкция по любому из пп. 1-11, частица AAV по п. 12 или п. 13, или композиция по п. 14 или п. 15 для применения при лечении синдрома Ашера III типа.
37. Конструкция по любому из пп. 1-11, частица AAV по п. 12 или п. 13, или композиция по п. 14 или п. 15 для применения при лечении пигментной дистрофии сетчатки.

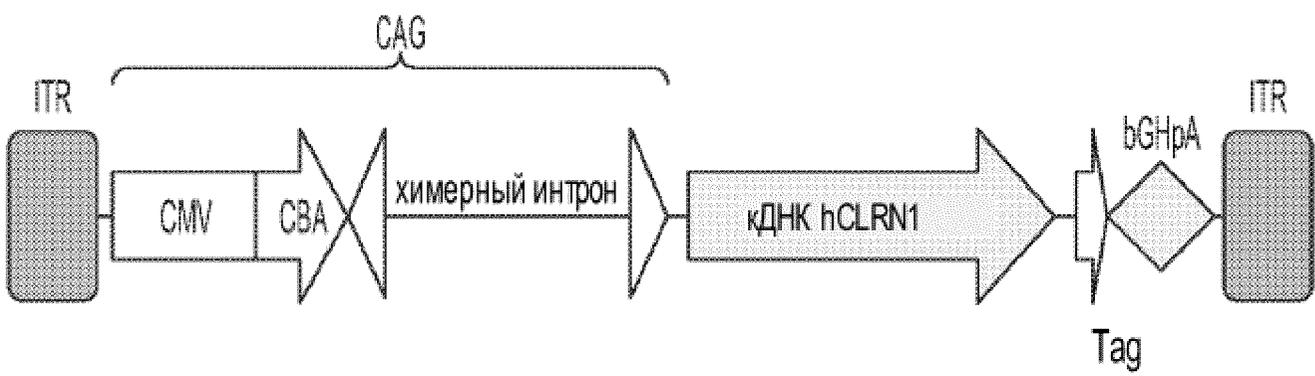
38. Набор, содержащий композицию по п. 14 или п. 15.



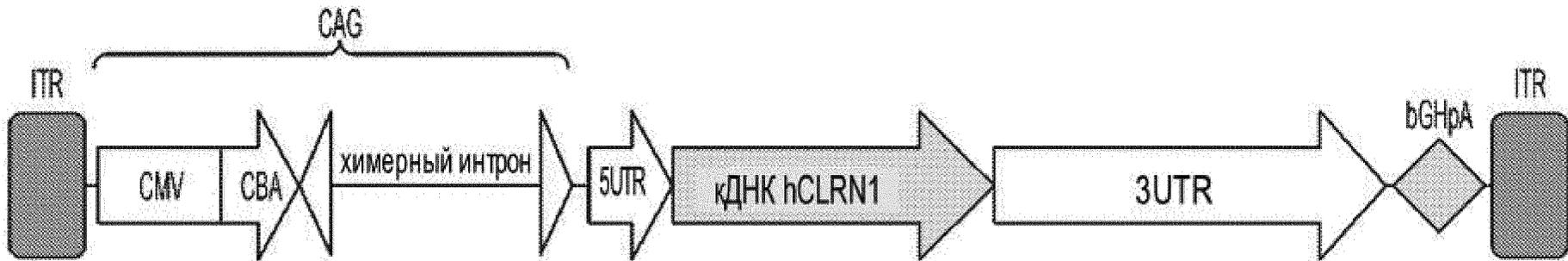
Фиг. 1



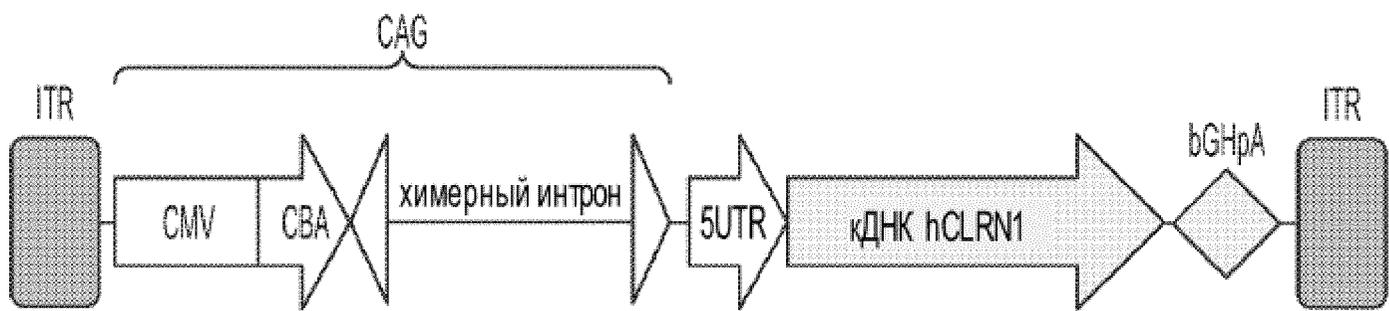
Фиг. 2



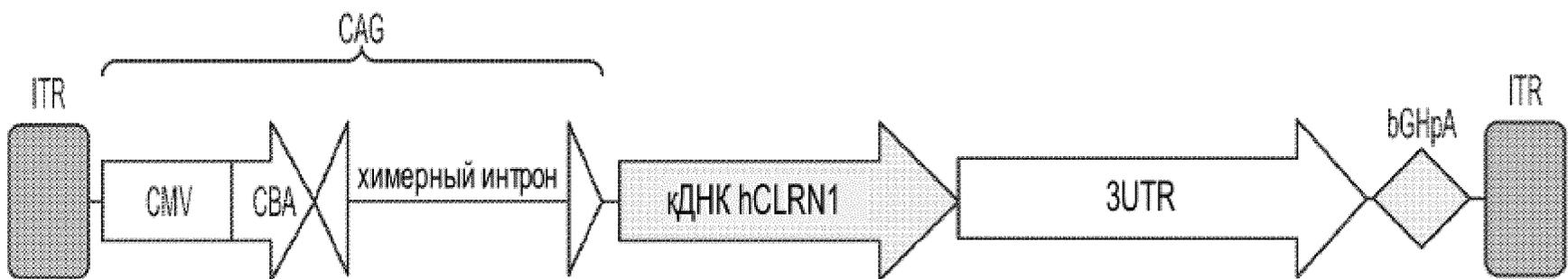
Фиг. 3



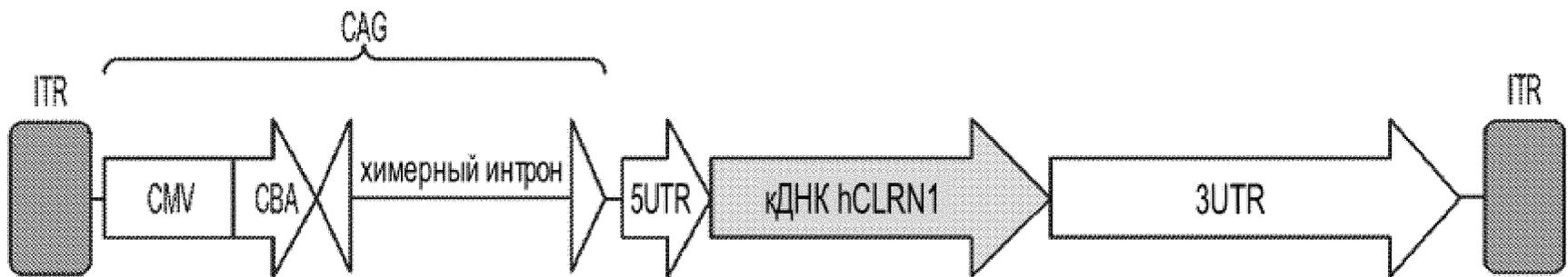
Фиг. 4



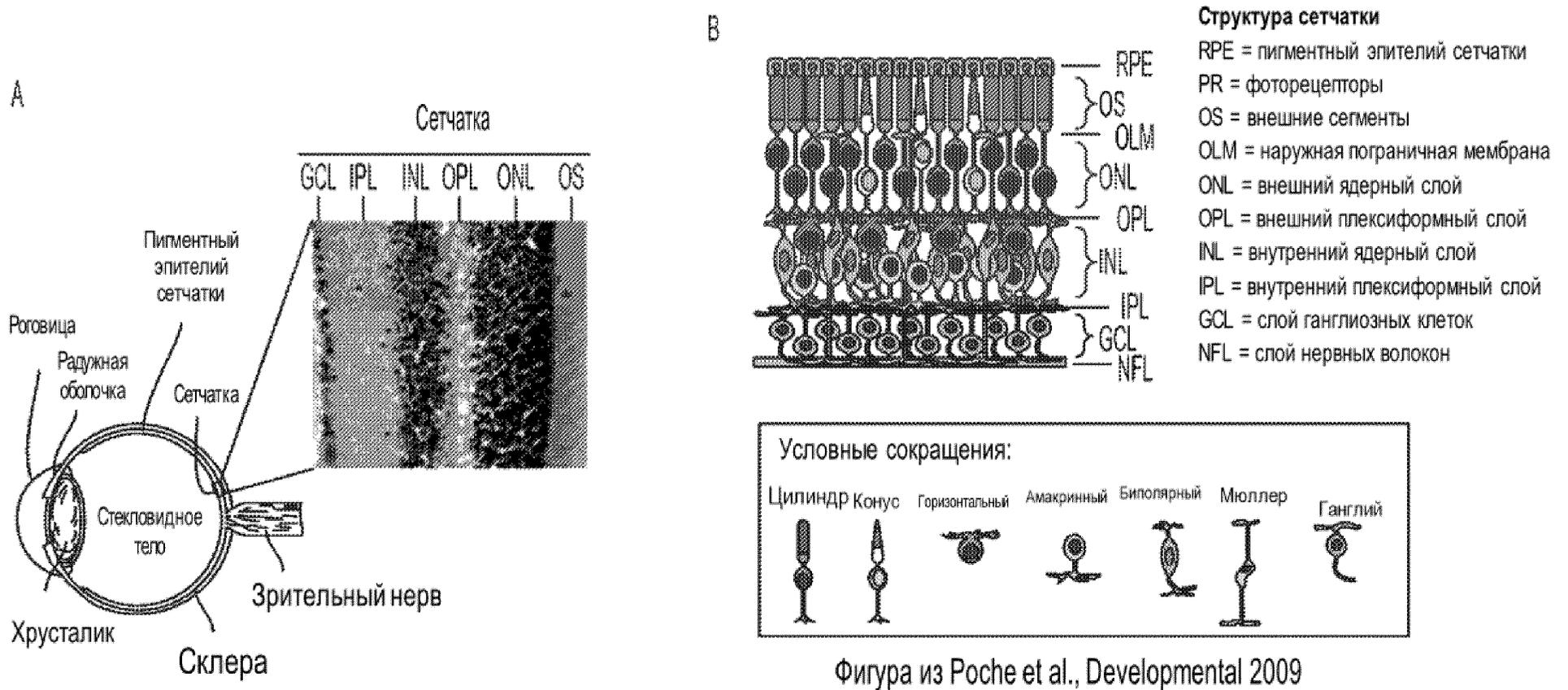
Фиг. 5



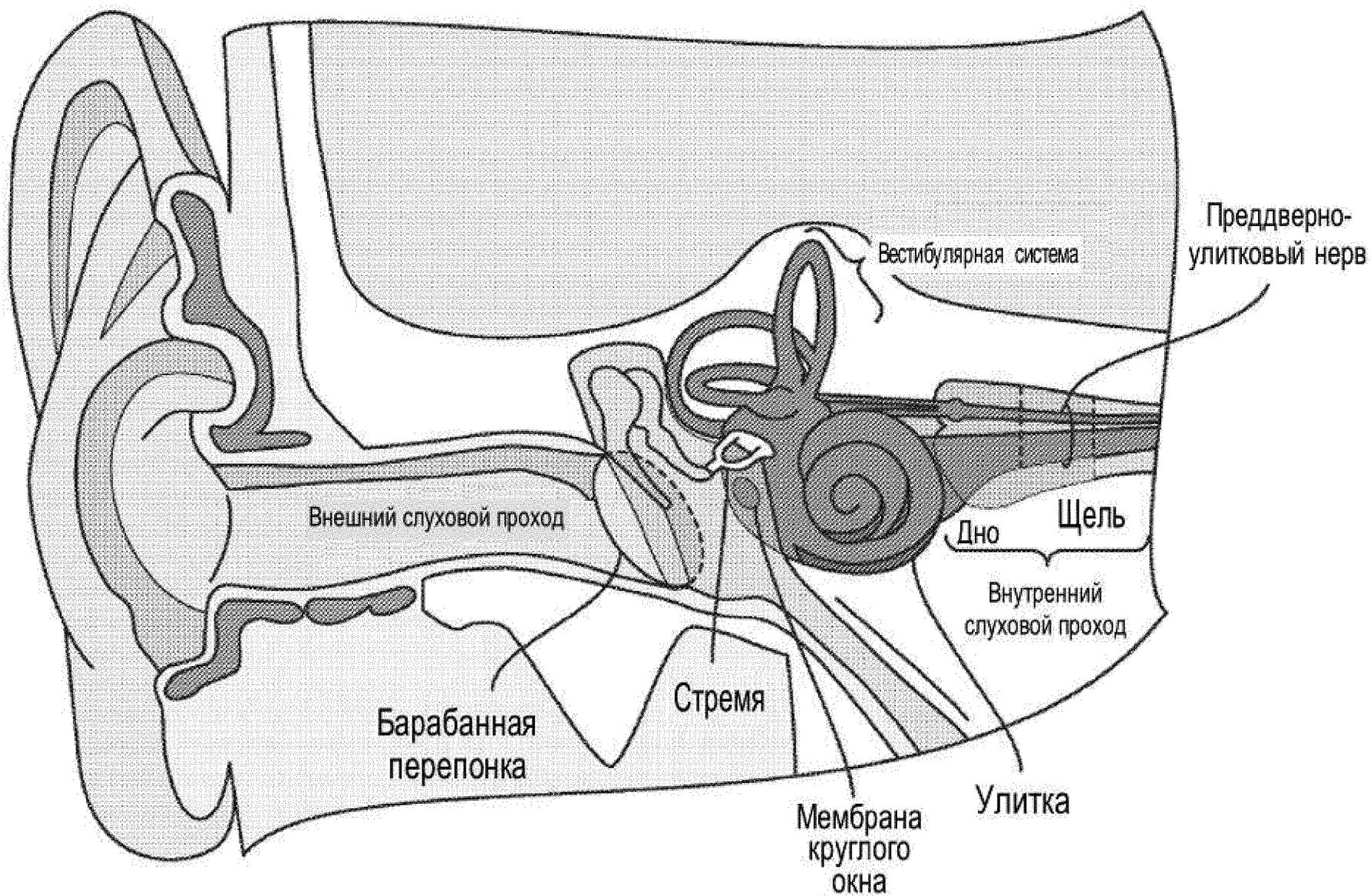
Фиг. 6



Фиг. 7



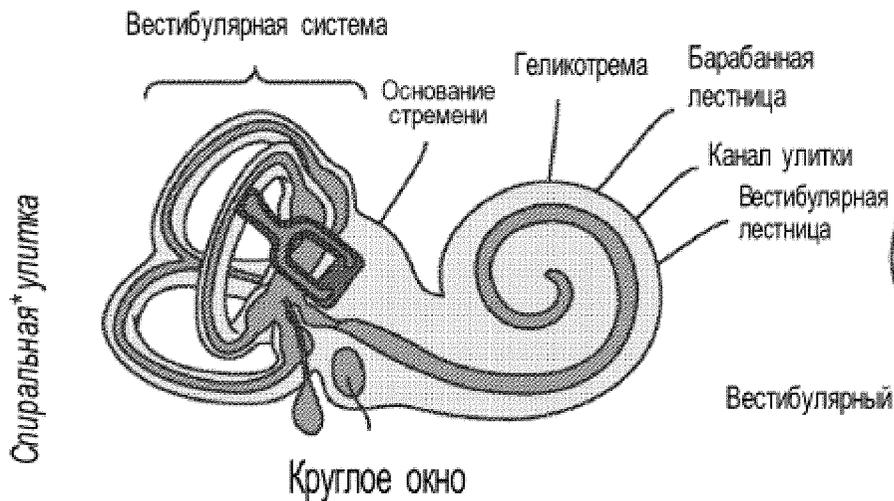
Фиг. 8



Фиг. 9

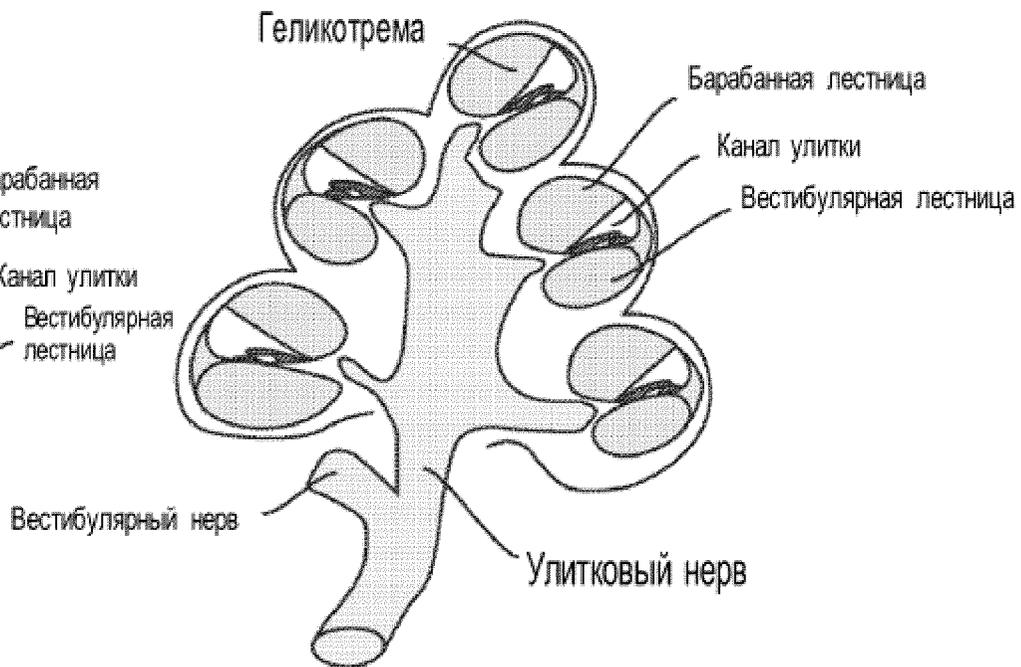
А

### Спиральная улитка

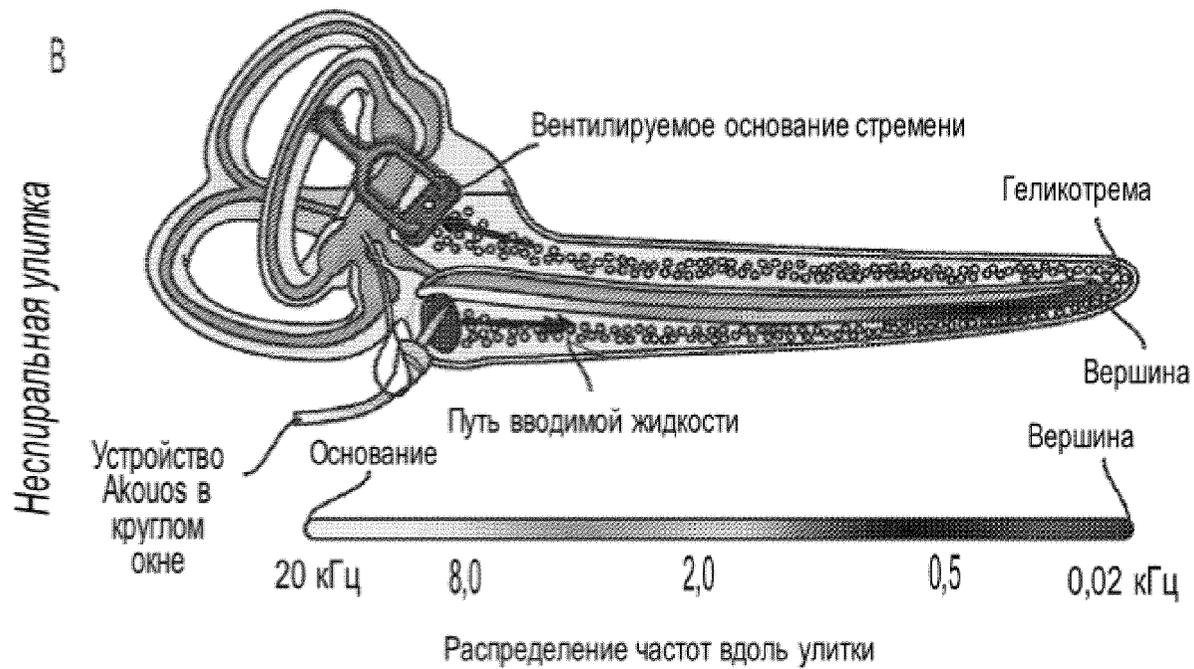
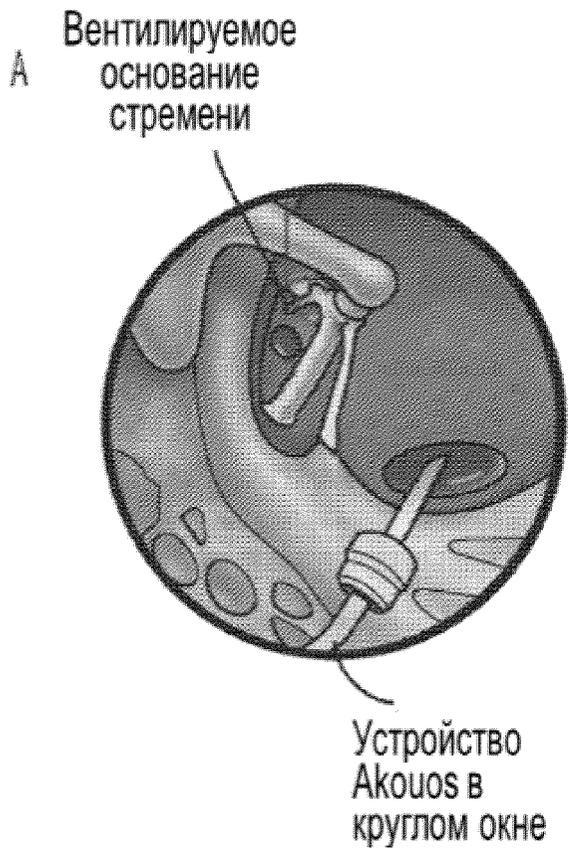


В

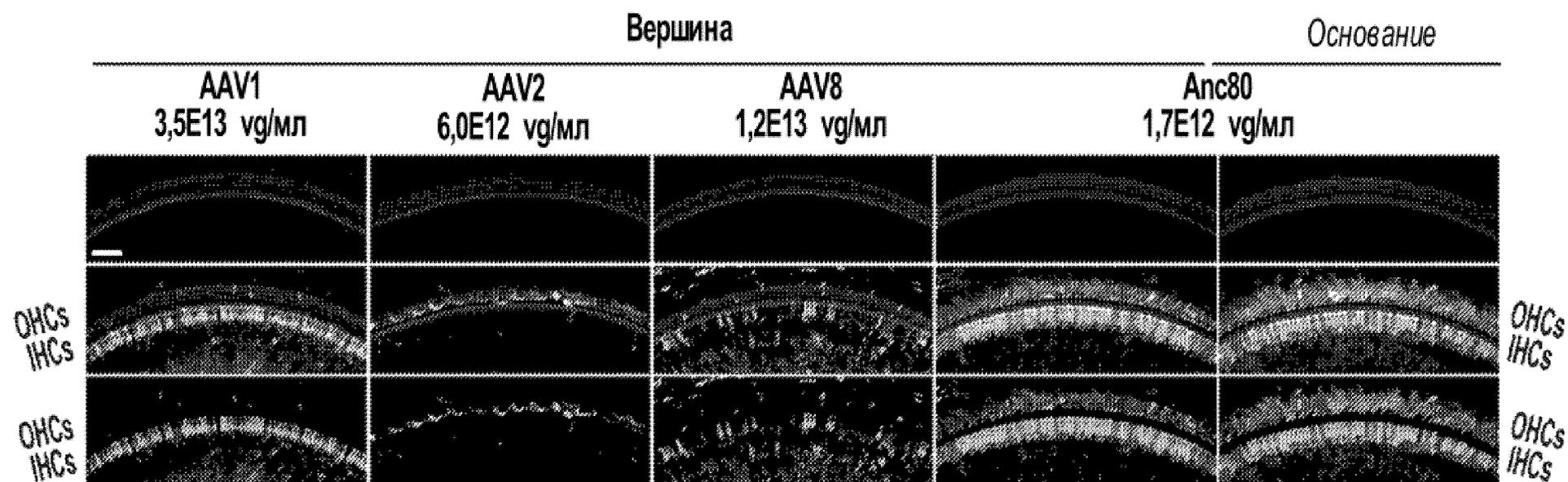
### Поперечное сечение улитки



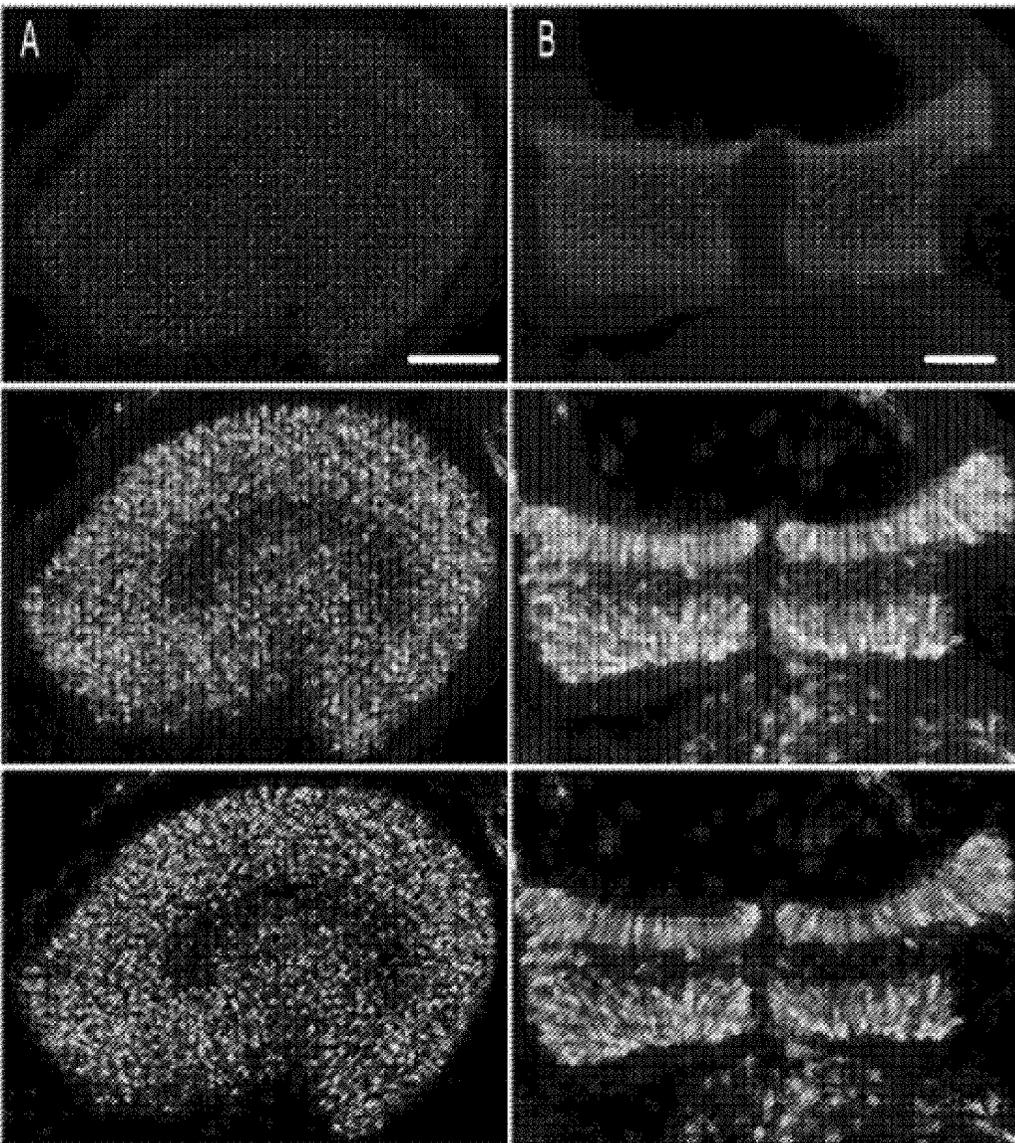
Фиг. 10



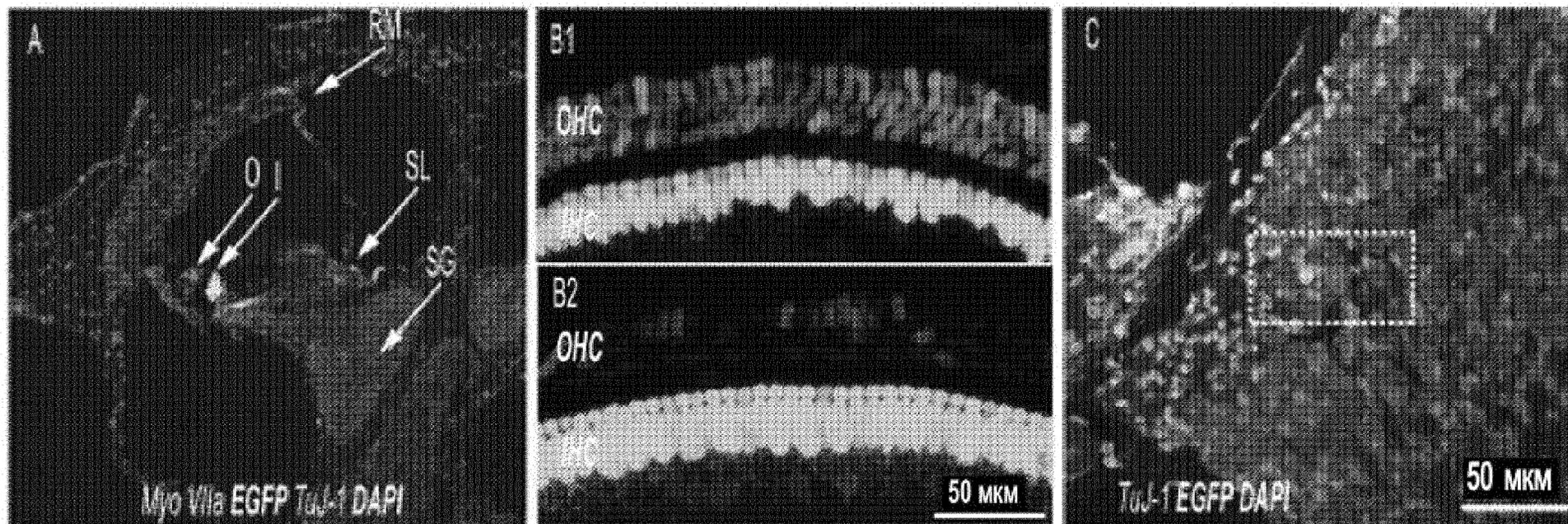
Фиг. 11



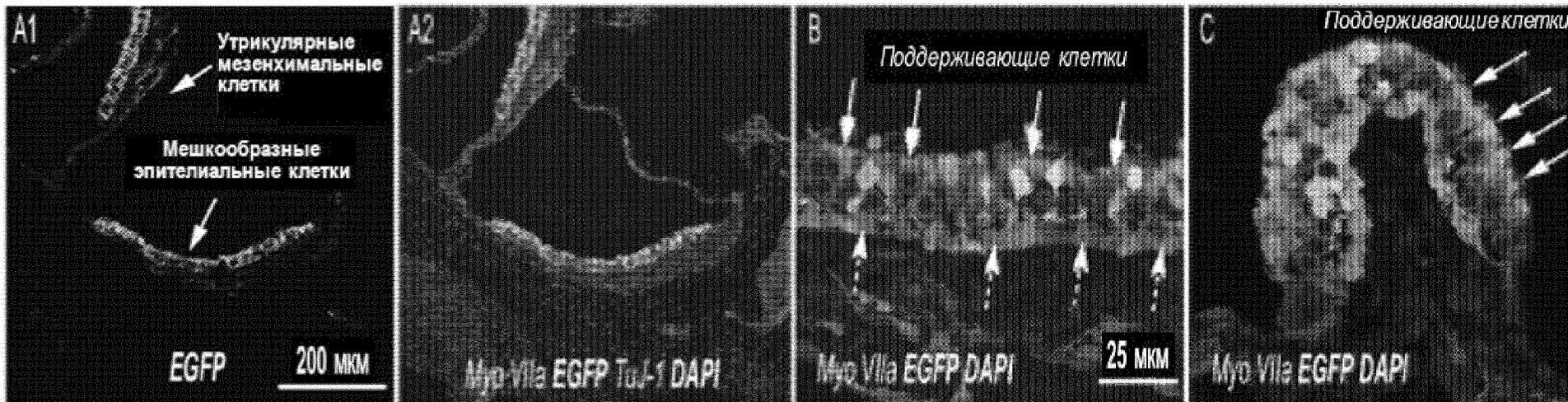
Фиг. 12



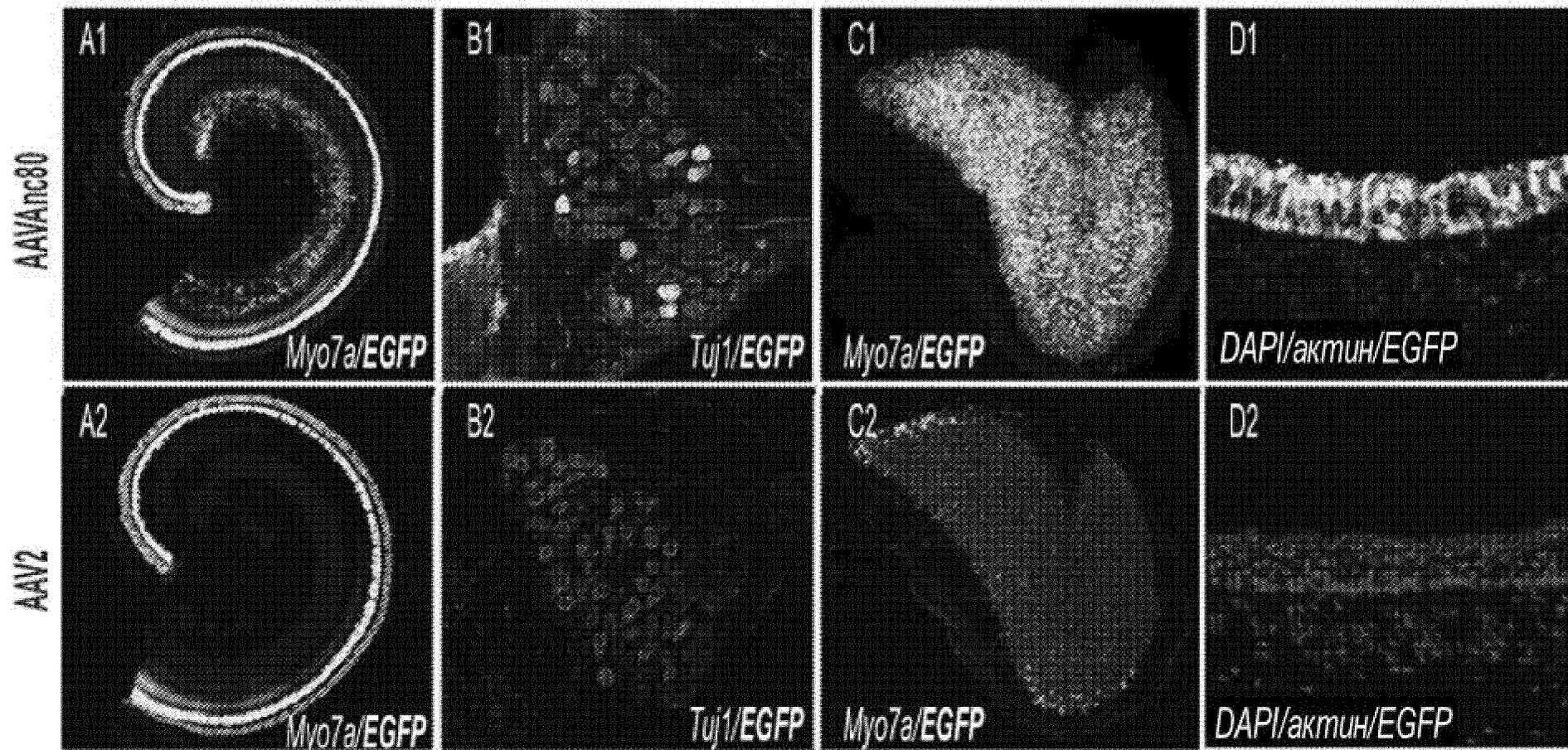
Фиг. 13



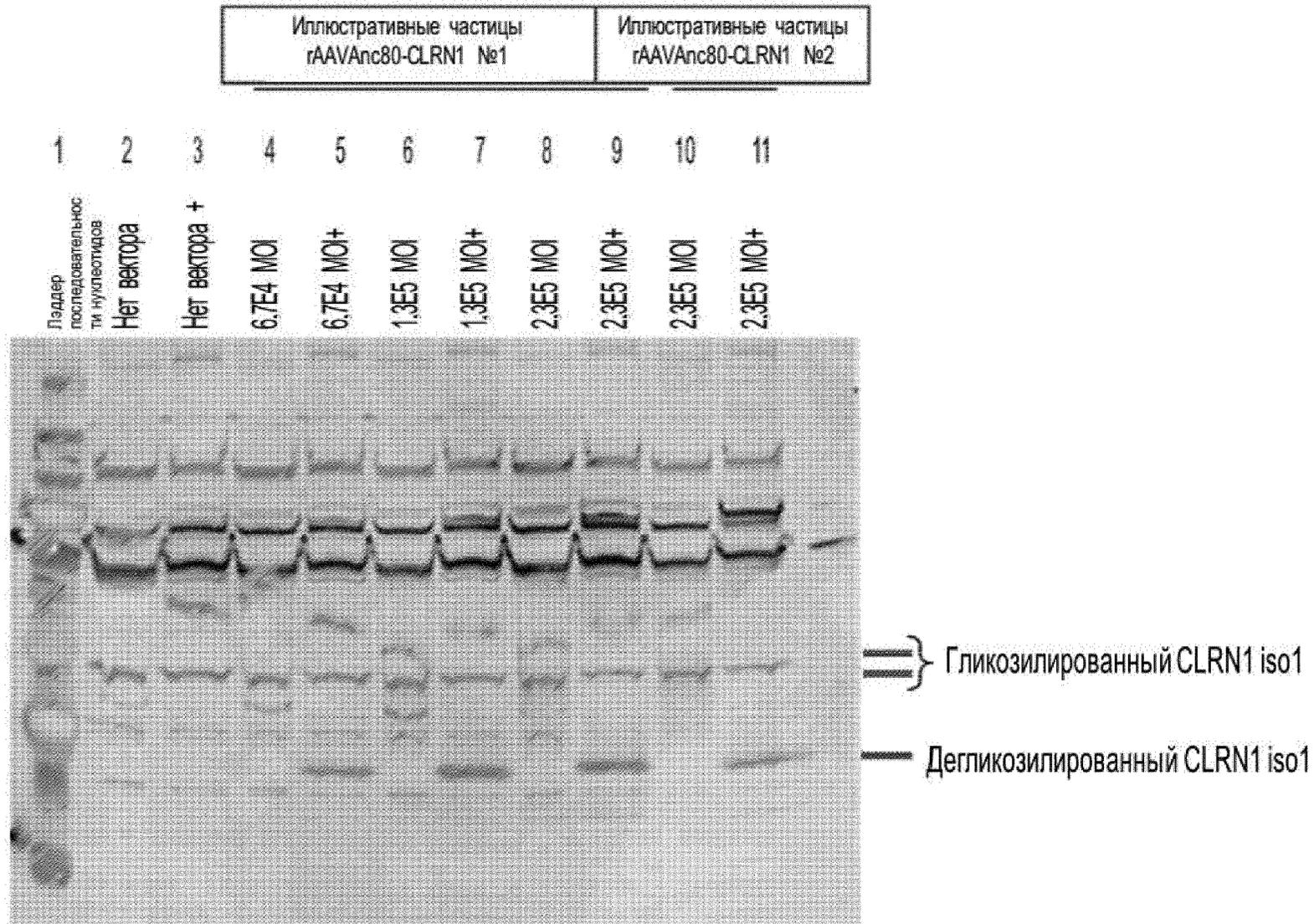
Фиг. 14



Фиг. 15

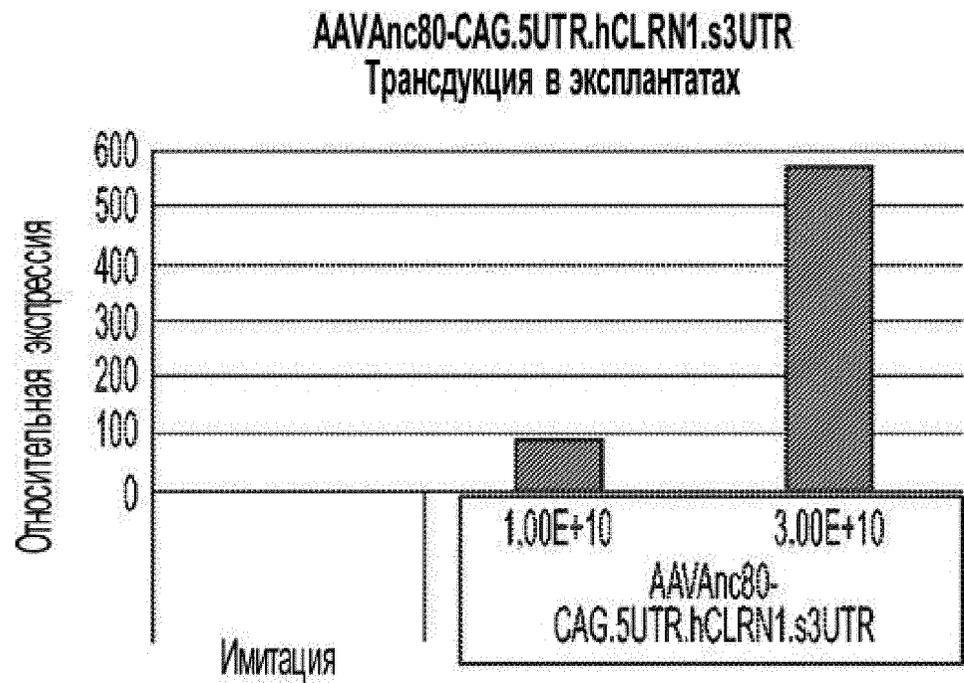


Фиг. 16

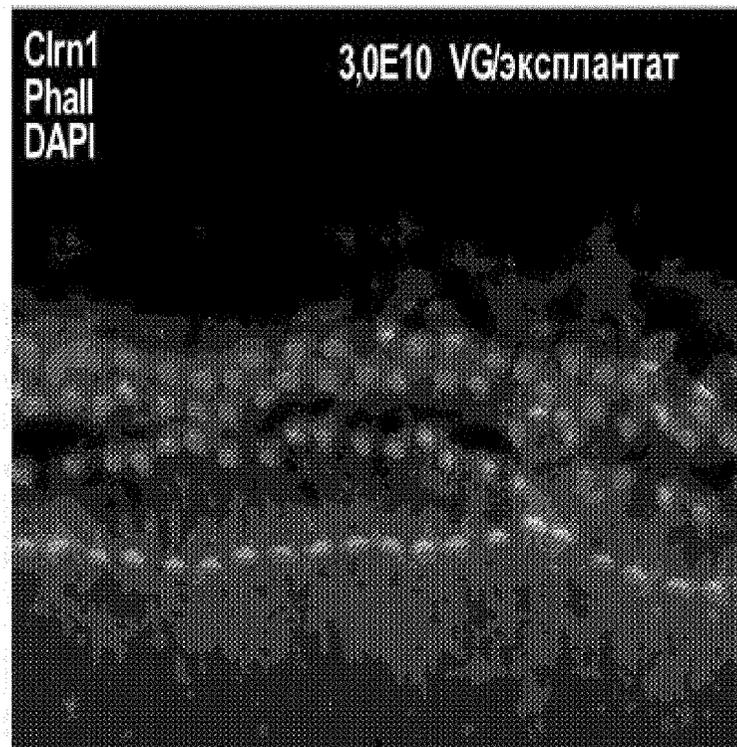


'+' обработка PNGазой F

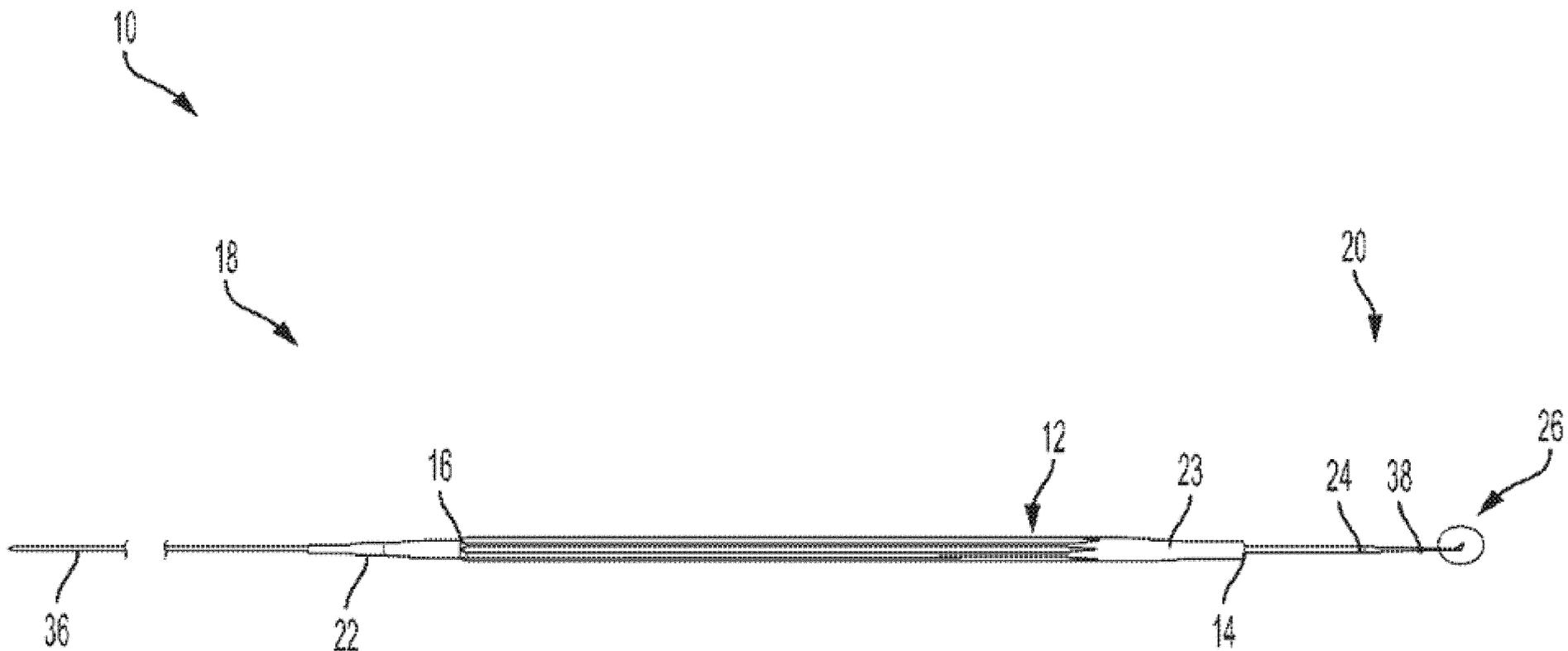
Фиг. 17



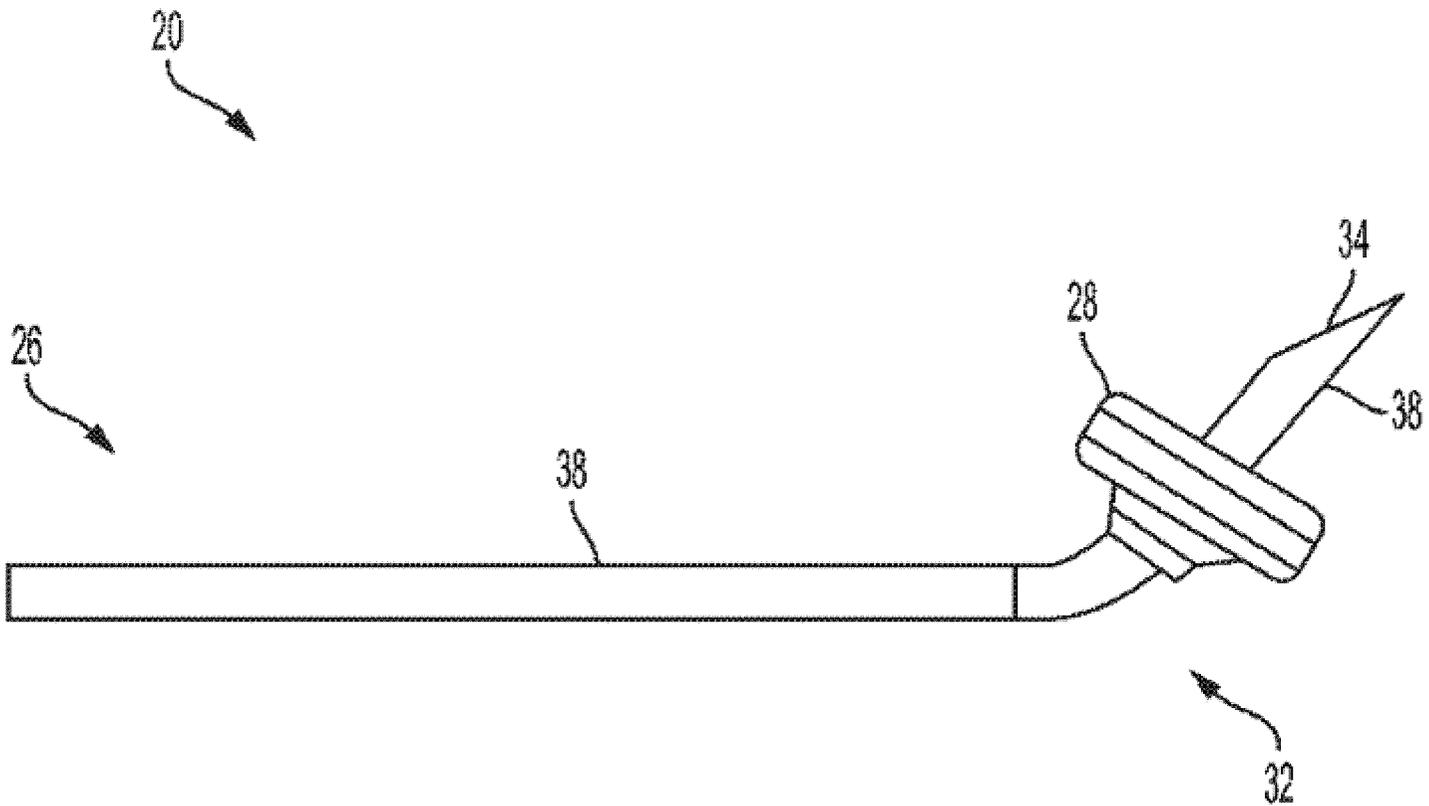
Фиг. 18А



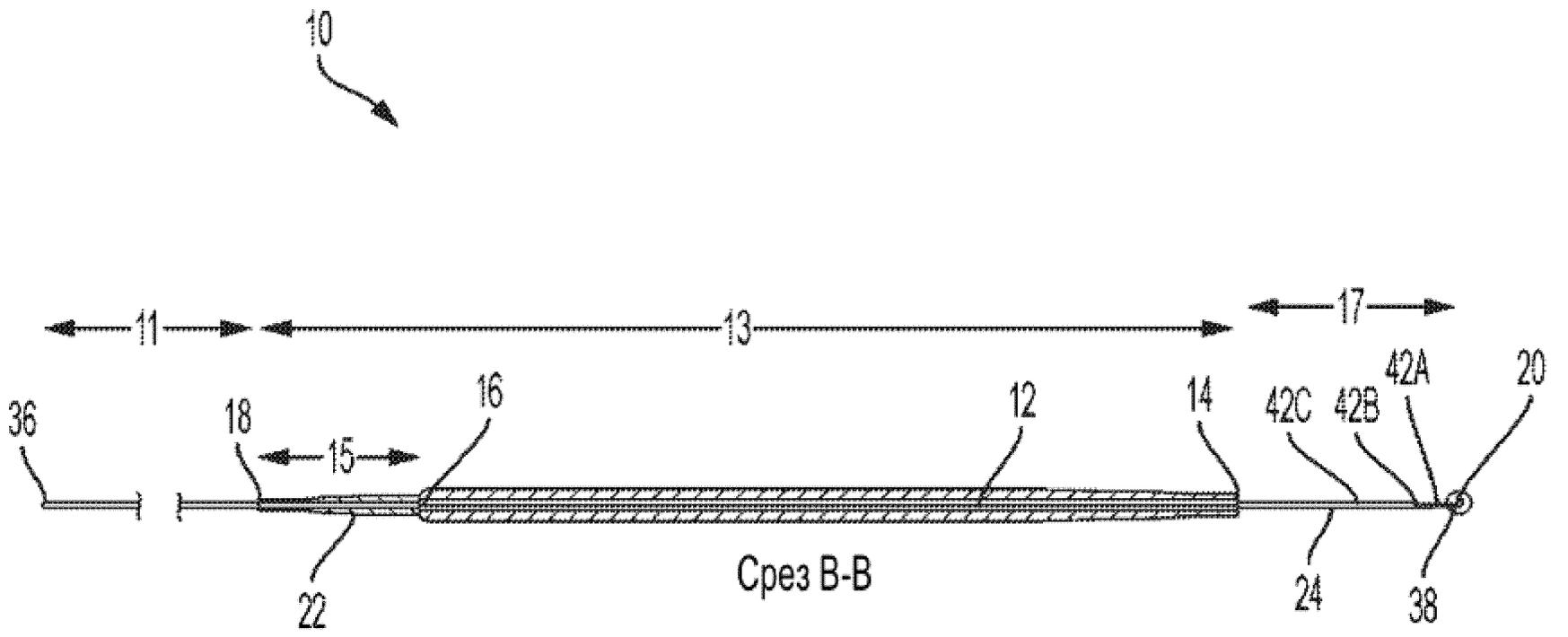
Фиг. 18В



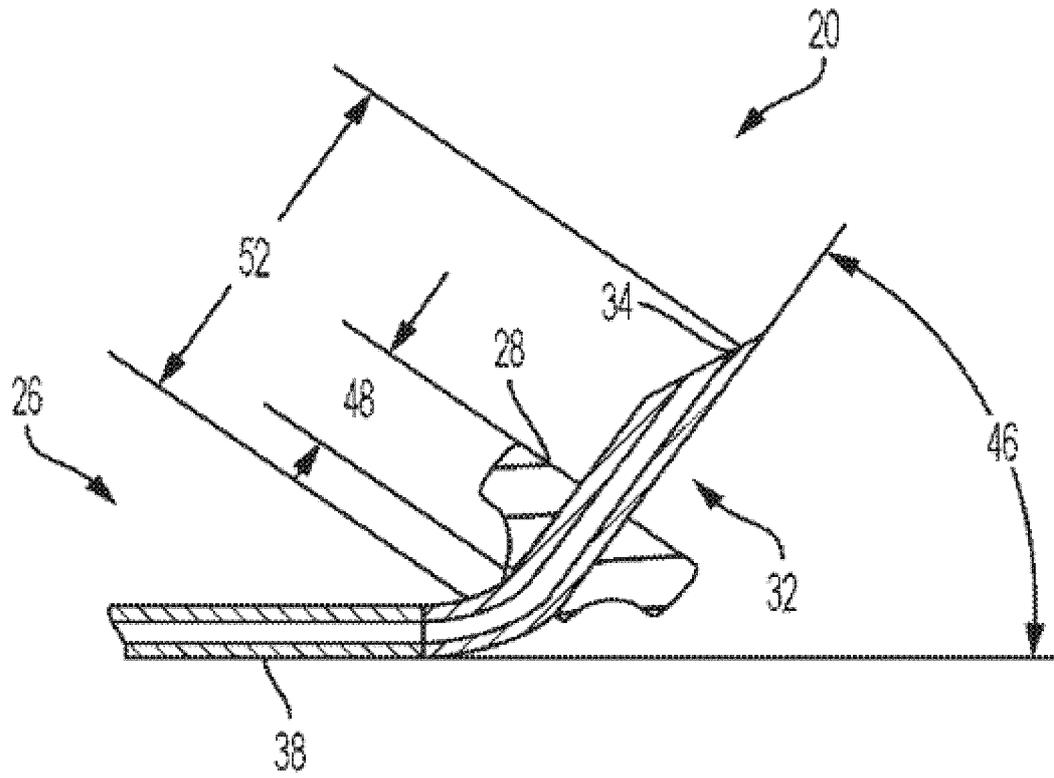
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22