

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044520**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.31

(21) Номер заявки
202091194

(22) Дата подачи заявки
2018.11.15

(51) Int. Cl. **C12N 15/63** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(54) **ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ОБЛАСТИ, КОДИРУЮЩИЕ RDH12, И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИЙ СЕТЧАТКИ**

(31) **62/586,624**

(32) **2017.11.15**

(33) **US**

(43) **2020.08.14**

(86) **PCT/US2018/061319**

(87) **WO 2019/099696 2019.05.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US);
ЮСиЭл БИЗНЕС ЛТД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Томпсон Дебра А. (US), Али Робин Р.,
Смит Александер Дж. (GB)**

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

(56) **WO-A2-2015168666
WO-A2-2011034947
WO-A2-2012167109**

(57) Изобретение относится к материалам, способам и применениям для лечения офтальмологической патологии, такой как врожденный амавроз Лебера, путем введения эффективного количества аденоассоциированного вируса AAV2, серотипа 5 (AAV 2/5) или AAV-5, содержащих пригодную для экспрессии кодирующую область для RDH12 человека.

B1

044520

044520

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По изобретению испрашивается приоритет по временной заявке на патент США № 62/586624, поданной 15 ноября 2017 г., которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Включение посредством ссылки материалов, поданных в электронном виде

Изобретение содержит, в качестве отдельной части раскрытия, перечень последовательностей в машиночитаемой форме (имя файла: 51914A_Seqlisting.txt; создан 9 ноября 2018 г.; 5230 байт - текстовый файл ASCII), который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Область техники

Это изобретение относится к медицинским способам лечения, таким как способы лечения человека с офтальмологической патологией, например, врожденным амаврозом Лебера, вследствие по меньшей мере одной мутации с потерей функции в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12), при этом способ включает в себя введение субъекту эффективного количества нуклеиновой кислоты, содержащей аденоассоциированный вирусный вектор, содержащий комплементарную ДНК (кДНК) RDH12 человека.

Уровень техники

Наследственные заболевания сетчатки (НЗС) являются основной причиной практической слепоты у детей. Врожденный амавроз Лебера (ВАЛ) и тяжелая дистрофия сетчатки с началом в раннем возрасте (ТДСРН) приводят к серьезному нарушению зрения, возникающему в период от рождения до возраста в несколько лет, и вместе составляют 5% или больше от всех НЗС (Koenekoop et al. 2004). ВАЛ/ТДСРН ассоциируется с аутосомно-доминантным и аутосомно-рецессивным типами наследования, вовлекая пигментный эпителий сетчатки и фоторецепторы - палочки и колбочки, в качестве основных мишеней (Weleber et al. 2013). Примерно 10% ВАЛ/ТДСРН вызывается мутациями в гене, кодирующем RDH12 (Kumaran et al. 2017). Учитывая роль RDH12 в цикле превращений родопсина, который обеспечивает хромофор для фоторецепторных клеток (Haeseleer et al. 2002; Chen et al. 2012), и который является критической терапевтической мишенью, RDH12 является одним из наиболее важных генов ВАЛ.

Несмотря на распространенность офтальмологических патологий, таких как наследственное заболевание сетчатки у людей и не относящихся к человеку млекопитающих, и знания о генах, кодирующих ретинол-дегидрогеназы, а также эффекте, который оказывают некоторые мутации в этих генах, не существует известного лечения ВАЛ, вызванного одним или большим количеством мутации в RDH12. Соответственно, в данной области техники по-прежнему существует потребность в материалах и способах, полезных для лечения дистрофий сетчатки, таких как ВАЛ, а также в материалах и способах, полезных для коррекции генетических аномалий, которые могут привести к таким дистрофиям.

Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение предлагает вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий кодирующую область для генного продукта гена RDH12, гена, кодирующего фермент ретинол-дегидрогеназу. Вектор AAV, содержащий RDH12, полезен для лечения дистрофических нарушений сетчатки, таких как врожденный амавроз Лебера (ВАЛ), путем предоставления рекомбинантной конструкции, в которой кодирующая область RDH12 находится под контролем регулируемого или контролируемого промотора, такого как гетерологичный промотор, чтобы обеспечить выполнение функции ретинол-дегидрогеназы у субъектов, у которых отсутствует активность RDH12 уровней дикого типа, как это будет происходить при мутациях в RDH12. Несмотря на преимущества относительно небольшого размера генома, относительно низкой тенденции к интеграции в ДНК хозяина и относительно низкого иммунотипа, неожиданным открытием стало то, что некоторые комбинации серотипа AAV, или псевдотипы, дают уровни экспрессии для кодируемого продукта RDH12, которые не являются терапевтически эффективным и/или которые демонстрируют нежелательную токсичность при введении субъектам для лечения дистрофии сетчатки. Совпадением с этим открытием является обнаружение того, что некоторые псевдотипы, такие как псевдотип AAV2/5, демонстрируют неожиданные и удивительно эффективные уровни экспрессии и профили токсичности, совместимые с терапевтическим применением для лечения дистрофии сетчатки. Субъекты, которых можно лечить с помощью данных способов, могут включать в себя тех, кто имеет потерю зрительной функции (например, нарушенный ответ при исследовании с электроретинограммой (ЭРГ)), но которые сохраняют некоторые фоторецепторные клетки, как определено с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). Таким образом, в одном аспекте, данное изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, у которого имеется офтальмологическая патология, такая как врожденный амавроз Лебера или ВАЛ, или другая клинически определенная офтальмологическая патология вследствие одной или большего количества мутаций с потерей функций в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12). Более конкретно, один аспект данного изобретения относится к способу лечения субъекта-человека, который имеет офтальмологическую патологию вследствие одной или большего количества мутаций с потерей функции в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12), причем способ включает в себя введение в по меньшей мере в один глаз субъекта адено-ассоциированного вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота содержит ДНК RDH12 человека, например кДНК RDH12 человека, и при этом ДНК

RDH12 (например, ДНК RDH12 человека) кодирует белок, который по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, офтальмологическая патология представляет собой врожденный амавроз Лебера (БАЛ). В некоторых вариантах осуществления, отмеченных выше, офтальмологическая патология представляет собой врожденный амавроз Лебера (БАЛ). В некоторых вариантах осуществления, ДНК RDH12, например кДНК RDH12, находится под контролем, на уровне экспрессии, промотора родопсин-киназы 1 (hGRK1) человека таким образом, что при этом промотор hGRK1 содержит или состоит по существу из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, аденоассоциированный вирусный вектор представляет собой AAV-2, серотип-5 (AAV2/5) или AAV-5. В некоторых вариантах осуществления, ДНК RDH12, например кДНК RDH12, содержит последовательность, которая, по меньшей мере, на 60 или 70% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту вводят в титре около от 2×10^{10} вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около 2×10^{12} вг/мл, например, в титре около от 2×10 вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до около 2×10^{12} вг/мл, например около 2×10^{11} вг/мл или около 2×10^{12} вг/мл. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту вводят в субретинальное пространство, например, при этом микроинъекционную канюлю вводят в субретинальное пространство.

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей ДНК RDH12 человека, например кДНК RDH12 человека, причем ДНК RDH12 (например, ДНК RDH12 человека, такая как кДНК) кодирует белок, который по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 2, причем ДНК RDH12 находится под контролем промотора родопсинкиназы 1 (hGRK1) человека. В некоторых вариантах осуществления, промотор hGRK1 содержит или состоит по существу из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, ДНК RDH12 человека, например кДНК RDH12 человека, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, ДНК RDH12 человека, например кДНК RDH12 человека, по меньшей мере на 60 или 70% идентична полноразмерной SEQ ID NO: 1.

Еще один аспект данного изобретения представляет собой нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе, для применения в лечении субъекта-человека, который имеет офтальмологическую патологию вследствие одной или большего количества мутаций с потерей функции в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12). В некоторых вариантах осуществления, офтальмологическая патология представляет собой врожденный амавроз Лебера (БАЛ).

Еще один аспект данного изобретения представляет собой вирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую RDH12, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, аденоассоциированный вирусный вектор представляет собой AAV-2, серотип-5 (AAV2/5) или AAV-5.

Другой аспект данного изобретения представляет собой вирусный вектор, описанный в данном документе, для применения в лечении субъекта-человека, который имеет офтальмологическую патологию вследствие одной или большего количества мутаций с потерей функции в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12). В некоторых вариантах осуществления, офтальмологическая патология представляет собой врожденный амавроз Лебера (БАЛ).

Другой аспект данного изобретения относится к выделенной клетке-хозяину, содержащей вирусный вектор, как описано в данном документе, или нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка-хозяин экспрессирует белок RDH12 человека.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области техники, к которой относится данное изобретение. В данном документе описаны способы и материалы для использования в данном изобретении; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. В случае конфликта, данное описание, включая определения, будет иметь преимущество.

Другие признаки и преимущества данного изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и фигур, а также из формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Активность RDH в цикле превращений родопсина и фоторецепторных клетках. (А) В цикле превращений родопсина витамин А преобразуется в 11-цис-ретиноль, хромофор зрительных пигментов, и утилизируется полностью-транс-ретиноль, высвобождающийся после обесцвечивания. (В) Для пары ПЭС-фоторецепторных клеток продемонстрирован ретиноидный путь. RDH8 в наружном сегменте может уменьшать количество транс-ретиноля. RDH12 во внутреннем сегменте может уменьшать количество

полностью-транс-ретиная, 11-цис-ретиная и других токсичных коротко-цепочечных альдегидов. Сокращения: ПцПАЛ, 11-цис-ретиная; ПцПОЛ, 11-цис-ретинол; ПтПАЛ, полностью-транс-ретиная; ПтПОЛ, полностью-транс-ретинол; RCHO, коротко-цепочечный альдегид; RCHОН, коротко-цепочечный спирт; Рд, родопсин; Мрд, метародопсин.

Фиг. 2. Экспрессия и локализация рекомбинантного RDH12 в мышах, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. (А) Схема AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 генно-терапевтической конструкции, в которой кДНК RDH12 человека клонируют ниже промотора родопсинкиназы человека, между последовательностями инвертированных концевых повторов, полученных из генома AAV2. (В, С) Экспрессия белка RDH12 человека в сетчатках мыши спустя 6 недель после субретинальной инъекции AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг) или ФСБ, оцененная с использованием антител, специфичных к Rdh12 мыши или RDH12 человека. (В) Вестерн-анализ лизатов сетчатки из мышей C57BL/6J, мышей Rdh12^{-/-}, инъецированных ФСБ, и мышей Rdh12^{-/-}, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. (С) Иммуногистохимический анализ демонстрирует локализацию нативного Rdh12 мыши (темно-серый) в ВС, НЯС и НСС сетчатки у мышей C57BL/6J, но не у мышей Rdh12^{-/-}, тогда как рекомбинантный RDH12 человека (светло-серый) в результате инъекции AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 демонстрирует одинаковую локализацию как для мышей C57BL/6J, так и для Rdh12^{-/-}. Фазово-контрастные изображения (слева). Сокращения: ИКП, инвертированный концевой повтор; hGRK1, промотор родопсин-киназы человека; СД/СА, сплайс-донорный/сплайс-акцепторный сайт вируса обезьян 40 (Simian virus 40); hRDH12, кДНК RDH12 человека; полиА, сигнал полиаденилирования вируса обезьян 40; ПЭС, пигментный эпителий сетчатки; НС, наружные сегменты; ВС, внутренние сегменты; НЯС, наружный ядерный слой; НСС, наружный сетчатый слой; ВЯС, внутренний ядерный слой; ВСС, внутренний сетчатый слой; СГК, слой ганглиозных клеток.

Фиг. 3. AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 генно-заместительная терапия восстанавливает функцию RDH12 у мышей с дефектом Rdh12. (А) ВЭЖХ анализ редуцтазной активности сетчатки в сетчатках из мышей C57BL/6J и Rdh12^{-/-}, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг) или ФСБ, или не инъецированных. Спустя 6 недель после инъекции формирование полностью-транс-ретинола количественно определяли в анализах с полностью-транс-ретином в качестве субстрата. Каждая точка на графике представляет собой среднее \pm среднеквадратическая ошибка для минимум 5 независимых экспериментов, где сетчатки из от 3 до 5 мышей объединяли и анализировали в трех повторностях. C57BL/6J; Rdh12^{-/-}; Rdh12^{-/-}, инъецированные ФСБ; /// Rdh12^{-/-}, инъецированные AAV. (В) Иммуногистохимия рекомбинантной экспрессии RDH12 в полном срезе сетчатки мыши Rdh12^{-/-}, оцененная 16 недель после инъекции AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. RDH12 человека (светло-серый) локализуется в ВС, НЯС и НСС инъецированной области сетчатки (правая сторона изображения).

Фиг. 4. AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 генно-заместительная терапия уменьшает световое повреждение у мышей-альбиносов с дефектом Rdh12. Анализ ЭРГ проводили за одну неделю до и одну неделю после воздействия 5000 люкс в течение 2 ч, на мышах, которым инъецировали в один глаз AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 и которых не инъецировали в контралатеральный глаз. Реакции в сумраке (только для палочек и комбинированные для палочек-колбочек) были количественно определены для групп из 10-13 мышей, и был рассчитан процент первоначальной реакции по ЭРГ, оставшейся после светового повреждения. Представлены усредненные результаты с среднеквадратическими ошибками, а также значимость различий между инъецированными и неинъецированными глазами, рассчитанная с использованием анализа двустороннего парного критерия Стьюдента.

Фиг. 5. AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 не оказывает существенного влияния на установившиеся уровни 11-цис-ретиная в сетчатке. Мыши получали AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг) или ФСБ путем субретинальной инъекции, или они не были инъецированы. После темновой адаптации в течение ночи ретиноиды экстрагировали в тусклом красном свете и количественно определяли анализом ВЭЖХ. (А) Типичные хроматограммы для каждого режима обработки; указаны пики для син-11-цис-ретиная оксима, анти-11-цис-ретиная оксима и син-полностью-транс-ретиная оксима. Общие уровни в сетчатке (В) 11-цис-ретиная и (С) полностью-транс-ретиная для каждого режима обработки \pm среднеквадратическая ошибка (■ неинъецированные C57BL/6J; неинъецированные Rdh12^{-/-}; /// инъецированные AAV Rdh12^{-/-}; инъецированные ФСБ Rdh12^{-/-}).

Фиг. 6. AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 не влияет отрицательно на функцию сетчатки. Электроретинограммные (ЭРГ) реакции в сумраке (только для палочек и комбинированные для палочек-колбочек) и при дневном свете (опосредованные колбочками) записывали спустя 6 недель после обработки для мышей C57BL/6J, неинъецированных; Rdh12^{-/-}, неинъецированных; и Rdh12^{-/-}, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (вплоть до 2×10^9 вг). Показаны ЭРГ для репрезентативного животного в каждой группе обработки, измеренные спустя 6 недель после инъекции.

Фиг. 7. Локализация зрительных пигментов не нарушается AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. Спустя 16 недель после обработки оценивали иммуногистохимическую локализацию родопсина и опсина колбочек у неинъецированных и инъецированных ($1,3 \times 10^9$ вг) мышей Rdh12^{-/-}. Экспрессия белка RDH12 человека

в ВС и НЯС (светло-серый). Родопсин и красный/зеленый опсин (темно-серый) в глазах, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. Сокращения такие же, как для фиг. 2.

Фиг. 8. Структура сетчатки не повреждается при длительной экспрессии AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. Анализ с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) глаз мышей C57BL/6J и *Rdh12^{-/-}*, проведенный спустя 54 недели после введения AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (вплоть до 2×10^9 вг).

Фиг. 9. Инфильтрация макрофагов CD68+ и экспрессия RDH12 в сетчатках, инъецированных AAV2/8-hGRK1p.hRDH12. Мышей *Rdh12^{-/-}* и C57BL/6J оценивали с помощью иммуногистохимического анализа спустя 8 недель после субретинальной инъекции AAV2/8-hGRK1p.hRDH12 (2×10^9 вг). Экспрессия RDH12 человека в ВС, НЯС и НСС (светло-серый) и CD68-мечение макрофагов (белый). Сокращения такие же, как для фиг. 2.

Подробное описание сущности изобретения

Наследственная дегенерация сетчатки является редкой причиной полной потери зрения, которая находится в центре современных усилий по разработке целевой

генной терапии. Опосредованная вирусным вектором соматическая генная терапия продемонстрировала большие перспективы в лечении животных моделей для человеческих дегенеративных заболеваний сетчатки. На сегодняшний день был проведен ряд успешных исследований с использованием доставки генов, опосредованной аденоассоциированным вирусом (AAV), для избавления от дегенерации фоторецепторов в моделях с небольшими животными (AH et al. 2000; Pang et al. 2012; Pawlyk et al. 2010; Pawlyk et al. 2005; Tan et al. 2009) и в моделях с большими животными (Acland et al. 2001; Alexander et al. 2007; Beltran et al. 2012; Komaromy et al. 2010; Lheriteau et al. 2009). В этих случаях, пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) или фоторецепторы были основными целями для экспрессии трансгена. Кроме того, клинические испытания фазы I, включающие в себя генную терапию для пациентов с врожденным амаврозом Лебера (ВАЛ), нацеленную на ПЭС (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008), и совсем недавно хориоидермию (Maclaren et al. 2014), уже достигли некоторых успехов. В данный момент нет клинических испытаний с использованием AAV-опосредованной генной заместительной терапии для лечения пациентов с наследственной дегенерацией сетчатки, вызванной мутациями в RDH12.

Заинтересовавшись разработкой AAV-опосредованной генной терапии для лечения индивидов с мутациями в RDH12, мы создали аденоассоциированные вирусные векторы, несущие кДНК RDH12 человека, экспрессия которых находится под контролем промотора родопсин-киназы. В данном раскрытом исследовании векторов с капсидами, полученными из серотипа AAV 5 или серотипа AAV 8, мы продемонстрировали, что субретинальная доставка AAV2/5-hGRK1p.RDH12 у мышей с дефектным *Rdh12* (*Rdh12^{-/-}*) приводит к экспрессии рекомбинантного RDH12 человека, который стабилен, правильно локализован, восстанавливает редуктазную активность сетчатки, снижает восприимчивость к световым повреждениям и не вызывает токсичности сетчатки, наблюдаемой при AAV2/8-hGRK1p.hRDH12. Эта конструкция AAV2/5-hGRK1p.RDH12 обеспечивает продукт для заместительной генной терапии RDH12.

RDH12.

Мутации в гене, кодирующем ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12), вызывают тяжелую дегенерацию сетчатки с началом в раннем возрасте, чаще всего диагностируемую как врожденный амавроз Лебера (ВАЛ) или тяжелая дистрофия сетчатки с началом в раннем возрасте (ТДСРН). Член семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз, RDH12 необходим для уменьшения уровней ретинальдегидов, которые порождаются активностью цикла превращений витамина А, который является неотъемлемой частью светового ответа фоторецепторных клеток. Когда зрительные пигменты, содержащие хромофор 11-цис-ретиноль, поглощают фотон света, 11-цис-ретиноль изомеризируется в полностью-транс-ретиноль, иницируя, таким образом, каскад трансдукции сигнала, который регулирует синаптическую передачу сигналов. Инактивация зрительных пигментов включает в себя высвобождение полностью-транс-ретиноля, его восстановление до полностью-транс-ретинола и возврат в пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) для возобновления хромофора 11-цис-ретиноля (фиг. 1А). Когда эти реакции переработки неэффективны или нарушаются, например, в результате старения или наследственного заболевания, ретинальдегиды и конденсированные продукты ретинальдегидов накапливаются в фоторецепторах и пигментном эпителии сетчатки, что приводит к серьезному повреждению внешней сетчатки (Ben-Shabat et al. 2001; Thompson et al. 2003; Sparrow, 2010; Chen et al. 2012).

Для защиты от токсичности в сетчатке экспрессируется ряд белков и ферментов, связывающих ретиноиды. RDH12 является членом семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз, которые используют НАДФН для восстановления широкого спектра субстратов, включая цис- и транс-ретинальдегиды (Haeseleer et al. 2002), альдегиды C9, образованные в результате липидного фотоокисления (Belyaeva et al. 2005; Lee et al. 2008; Marchette et al. 2010), и стероидные субстраты (Keller et al. 2007). Индивиды с мутациями с потерей функции в гене RDH12 демонстрируют фенотип тяжелой дегенерации сетчатки, часто диагностируемой как врожденный амавроз Лебера (ВАЛ) (Janecke et al. 2004; Thompson et al. 2005; Perrault et al. 2004; den Hollander et al. 2008; Mackay et al. 2011), для которой в данный момент нет лечения или лекарств. RDH12 локализуется в внутренних сегментах фоторецепторных клеток - палоч-

чек и колбочек (Haeseleer et al. 2002; Maeda et al. 2006), где он защищает от светового повреждения, вызванного, по меньшей мере частично, реакционноспособными ретинальдегидами (Maeda et al. 2006). Было продемонстрировано, что полностью-транс-ретиналь, формирующийся после воздействия света, высвобождается из наружных сегментов фоторецептора во внутренние сегменты, и для его эффективного удаления из фоторецепторных клеток требуется активность как RDH8, присутствующего в наружных сегментах, так и RDH12, присутствующего во внутренних сегментах (Chen et al. и др. 2012) (фиг. 1B). Таким образом, RDH12 также может играть важную роль в уменьшении присутствия 11-цис-ретиналя в избытке по сравнению с биосинтезом опсина, который может проникать во внутренний сегмент из субретинального пространства (Chen et al. 2012).

Чтобы исследовать потенциал генной заместительной терапии для ВАЛ/ТДСРН вследствие мутаций RDH12, мы создали аденоассоциированные вирусные векторы, несущие кДНК RDH12 человека, в которых экспрессия находится под контролем промотора родопсин-киназы, который управляет специфической для фоторецепторных клеток экспрессией (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young et al. 2003). ДНК-конструкцию упаковывали в капсид, полученный из AAV серотипа 8, который опосредует эффективную и надежную трансдукцию фоторецепторных клеток (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013), или в капсид AAV серотипа 5, который опосредует трансдукцию фоторецепторов, но с более медленной кинетикой и менее выраженной экспрессией по сравнению с капсидом AAV серотипа 8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocca et al. 2007; Leberher et al. 2008).

В сравнительных исследованиях, выполненных на мышинной модели с дефектным *Rdh12* (*Rdh12^{-/-}*) (Kurth et al. 2007), наша работа продемонстрировала, что два вектора имеют существенно разные профили безопасности, при этом AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 демонстрирует неожиданные и удивительные эффективные уровни экспрессии и профили токсичности, совместимые с терапевтическим применением для лечения дистрофии сетчатки.

Последовательность RDH12 человека.

Последовательность иллюстративной кДНК RDH12 человека, состоящая из нуклеотидов от -10 до +980 относительно сайта инициации трансляции, кодирующая все семь транскрибируемых экзонов RDH12 (GenBank № NM_152443), представлена в SEQ ID NO: 1.

Полноразмерная последовательность белка RDH12 человека представлена в SEQ ID NO: 2.

Промотор родопсин-киназы (hGRK1p).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, используют замещающую генную конструкцию, в которой кДНК RDH12 человека, как описано в данном документе, помещают под контроль промотора родопсин-киназы человека (hGRK1). В некоторых вариантах осуществления, промотор hGRK1 имеет длину примерно 200 пар оснований (п. о.), и содержит короткий промотор, полученный из гена hGRK1 родопсин-киназы (PK), который, как было продемонстрировано, управляет специфической для клеток экспрессией в палочках и колбочках (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young et al. 2003). Иллюстративная последовательность промотора hGRK1 содержит нуклеотиды от -112 до +87 SEQ ID NO: 3 (Khani et al. 2007).

Вирусный вектор доставки.

Укороченную кДНК RDH12 человека, как описано выше, упаковывали в вектор доставки, например вектор AAV5 или AAV2/5.

Замещающие гены (кДНК) могут быть введены в любом эффективном носителе, например в любом препарате или композиции, способных эффективно доставлять компонент-ген в клетки *in vivo*. Подходы включают в себя вставку гена в непатогенные нереплицирующиеся вирусные векторы, включая рекомбинантные ретровирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус и вирус простого герпеса-1, или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды. Вирусные векторы трансфицируют клетки напрямую; плазмидная ДНК может доставляться "голой" или с помощью, например, катионных липосом (липофектамина) или дериватизированных (например, конъюгированных с антителами) конъюгатов полизина, грамацидина S, искусственных вирусных оболочек или других таких внутриклеточных носителей, а также *in vivo* выполняют прямую инъекцию генной конструкции или преципитацию $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Предпочтительным подходом для введения *in vivo* нуклеиновой кислоты в клетку является использование вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, например кДНК. Инфицирование клеток вирусным вектором имеет то преимущество, что большая часть клеток-целей может получить нуклеиновую кислоту. Кроме того, молекулы, кодируемые в пределах вирусного вектора, например, кДНК, содержащейся в вирусном векторе, эффективно экспрессируются в клетках, которые поглощают нуклеиновую кислоту вирусного вектора. Ретровирусные векторы и векторы, полученные из аденовирусов, можно использовать в качестве системы доставки рекомбинантных генов для переноса экзогенных генов *in vivo*, в частности в людей, в ряд типов клеток. Однако они не трансдуцируют фоторецепторные клетки с достаточной эффективностью, чтобы сделать их полезными для этого применения.

Еще одной вирусной векторной системой, полезной для доставки нуклеиновых кислот, является аденоассоциированный вирус (AAV). Аденоассоциированный вирус представляет собой встречающийся

в природе дефектный вирус, которому требуется другой вирус, такой как аденовирус или вирус герпеса, в качестве вспомогательного вируса для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла (Muzyczka et al. 1992). Это также один из немногих вирусов, которые могут интегрировать свою ДНК в неделящиеся клетки и проявляют высокую частоту стабильной интеграции (смотрите, например, Flotte et al. 1992; Samulski et al. 1989; и McLaughlin et al. 1988). Векторы, содержащие всего 300 пар оснований AAV, могут быть упакованы и могут интегрироваться. Пространство для экзогенной ДНК ограничено около 4,5 кб. Вектор AAV, такой как описанный в Tratschin et al., 1985, можно использовать для введения ДНК в клетки. С использованием векторов AAV в различные типы клеток были введены различные нуклеиновые кислоты (смотрите, например, Hermonat et al. 1984; Tratschin et al. 1984a; Tratschin et al. 1984b; Wondisford et al. 1988; и Flotte et al. 1993).

В предпочтительных вариантах осуществления, вирусный вектор доставки представляет собой рекомбинантный вирус AAV2/5. Перед введением конечный продукт может пройти серию этапов ультраочистки, чтобы соответствовать критериям клинической степени чистоты.

Выбор субъекта.

Субъекты, которые являются кандидатами для данных способов лечения, включают в себя тех, которые имеют диагноз ВАЛ, вызванный мутациями в гене, кодирующем RDH12. Субъекты, страдающие от других офтальмологических клинически определенных патологий, вызванных мутациями в гене, кодирующем RDH12, например, пигментная дистрофия сетчатки с началом в раннем возрасте, также могут лечиться с использованием способов, описанных в данном документе. Диагноз ВАЛ или другой офтальмологической патологии, вызванной мутациями в гене, кодирующем RDH12, может быть поставлен с использованием способов, известных в данной области техники.

Способы, описанные в данном документе, могут включать в себя идентификацию субъекта, например ребенка, подростка или молодого взрослого субъекта, у которого имеется ВАЛ или другая офтальмологическая патология, вызванная одной или большим количеством мутаций в гене, кодирующем RDH12, или у которого подозревают наличие ВАЛ или другой офтальмологической патологии, вызванной одной или большим количеством мутаций в гене, кодирующем RDH12 (например, исходя из наличия симптомов патологии и отсутствия другой очевидной причины), и получение образца, содержащего геномную ДНК из субъекта, обнаружение наличия мутаций в RDH12 с использованием известных молекулярно-биологических способов, и выбор пациента, который имеет мутацию в обоих аллелях RDH12, которые вызывают ВАЛ или другую патологию. Симптомы патологии включают в себя атрофию желтого пятна, истончение фовеальной зоны и нарушение ламинарной архитектуры, что приводит к ранней потере макулярного зрения и прогрессированию до зрения ПС (практической слепоты). Поля зрения сужаются в самом раннем возрасте измерения, и реакции по ЭРГ становятся не регистрируемыми в раннем взрослом возрасте. Обнаружение мутаций в RDH12 может включать в себя секвенирование всего или части гена RDH12 у субъекта и сравнение последовательности с контрольной последовательностью (например, номер доступа GenBank - NG_008321.1) для обнаружения мутации. Мутации со сдвигом рамки считывания, укорачивающие мутации, мутации, которые изменяют консервативную аминокислоту, мутации, которые влияют на сплайсинг транскрипта, или мутации, которые влияют на регуляторную (например, промоторную) область, рассматриваются как мутации, которые могут вызывать ВАЛ или другую офтальмологическую патологию, как описано в данном документе; изменение функции может быть подтверждено экспрессией мутанта *in vitro* (например, в культивируемых клетках) и анализом, например, ферментной функции. Иллюстративные мутации в гомозиготном состоянии включают в себя: Glu127X, Gln189X, Tyr226Cys, Ala269GlyfsX1 и Leu274Pro (все ссылки на позиции относятся к последовательности белка RDH12 SEQ ID NO: 2). Иллюстративные мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии включают: Thr49Met/Arg62X; Arg65X/Ala269GlyfsX1; His151D/Thr155Ile; His151D/Arg269GlyfsX1 (Janecke et al. 2004; Schuster et al. 2007). (Позиции относятся к последовательности белка SEQ ID NO: 2).

Пациенты с ВАЛ или другой офтальмологической патологией вследствие по меньшей мере одной мутации RDH12, которые можно лечить с использованием способа, описанного в данном документе, предпочтительно сохраняют некоторые фоторецепторы и зрительные функции, например, как это измерено с помощью стандартных проверок зрительных функций или полевых проверок и/или оптической когерентной томографии (ОКТ, например, ОКТ спектральной области (ОКТ-СО)). Способы, описанные в данном документе, могут включать в себя идентификацию субъектов, которым был поставлен диагноз ВАЛ или другой офтальмологической патологии вследствие по меньшей мере одной мутации RDH12, которые имеют по меньшей мере одну подтвержденную мутацию в RDH12, которая является причиной их патологии, и проверку их зрительной способности и обнаружение присутствия остаточных центральных фоторецепторов.

Примеры

Раскрытый и заявленный объект данного изобретения дополнительно описан в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Материалы и способы.

Следующие материалы и способы были использованы в экспериментах, раскрытых в приведенных ниже примерах.

Животные.

Разведение и анализ мышей $Rdh12^{-/-}$ были описаны ранее (Kurth et al. 2007). Мыши $Rdh12^{-/-}$, использованные в данном исследовании, были выведены путем спаривания братьев и сестер среди нульзиготных самцов и самок, которых содержали в виварии нашего учреждения. Мыши ДТ (дикого типа), использованные в данном исследовании, представляли собой C57BL/6 из Лаборатории Джексона (The Jackson Laboratory) (Уилмингтон, Массачусетс).

Были использованы трансгенные мыши следующих генотипов для исследований, описанных в данном документе: Мыши $Rdh12^{-/-}$ на основе C57BL/6J, гомозиготные по варианту $Rpe65$ -Met450 (M/M) (Kurth, 2007), и мыши-альбиносы $Rdh12^{-/-}$ на основе BALB/c, гомозиготные по варианту $Rpe65$ -Leu450 (L/L) (Chrispell, 2009), которые были получены скрещиванием. Мышей выращивали в цикле 12 ч (свет)/12 ч (тьма) и подвергали эвтаназии путем вдыхания CO_2 с последующим двусторонним пневмотораксом.

Конструирование плазмиды и получение рекомбинантных AAV2/5 и AAV2/8.

Человеческую кДНК RDH12 амплифицировали из кДНК сетчатки человека с помощью ПЦР с использованием праймеров, предназначенных для охвата всей кодирующей области RDH12, клонированной и секвенированной для проверки точности, как описано ранее (Janecke et al. 2004). Для конструирования векторов AAV, кДНК RDH12 встраивали в полилинкер исходного вектора pAAV-hGRK1-hrGFP. Полученный в результате вектор pAAV-hGRK1-Rdh12 был упакован в AAV. Псевдотипированные векторы AAV2/5 и AAV2/8 были получены путем двойной трансфекции: (1) векторной плазмиды AAV, кодирующей ген интереса, (2) вспомогательной плазмиды AAV, кодирующей белки Rep AAV из серотипа 2 и белки Cap из серотипа 5 или серотипа 8, и аденовирусные вспомогательные элементы, в клетки 293T. Трансфекцию и очистку осуществляли с использованием опубликованного протокола (Nishiguchi et al 2015). Через два дня после трансфекции клетки лизировали путем повторных циклов замораживания и оттаивания. После первоначальной очистки клеточного дебриса, компонент нуклеиновой кислоты клеточ-продуктов вируса удаляли обработкой Бензоназой. Частицы рекомбинантного вектора AAV очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием матрицы AVB, промывали в 1x ФСБ и концентрировали до объема 100-150 мл с использованием концентраторов Vivaspin 4 (10 кДа). Векторы титровали путем амплификации кПЦР.

Субретинальные инъекции.

Подгруппы мышей в возрасте примерно 4 недели находились под общей анестезией внутривентральной инъекцией кетамина (90 мг/кг)/ксилазина (9 мг/кг). 0,5% раствор пропаракаина наносили на роговицу в качестве местного анестетика. Зрачки расширяли местным применением тропикамида (0,5%). Под офтальмологическим хирургическим микроскопом был сделан небольшой разрез в роговице, прилегающей к каемке, с помощью иглы 30-го калибра. Тупая игла 34-го калибра, установленная на шприц Гамильтона, была введена через разрез позади хрусталика и протиснута через сетчатку. Все инъекции были выполнены субретинально в пределах носового квадранта сетчатки. Каждый глаз получал вплоть до 2×10^9 вг AAV2/5-(hGRK1)-hRDH12 в объеме вплоть до 2 мкл. Вектор, кодирующий RDH12, вводили отдельно в один глаз каждой мыши, получающей лечение, а контрлатеральные глаза не были инъектированы. При осмотре глазного дна после инъекции было обнаружено, что в большинстве случаев отслоилось больше чем 30% сетчатки, что подтверждает успешную субретинальную доставку.

Антитела.

В качестве первичных антител использовали: анти-Rdh12 кроличье поликлональное антитело (CSP), специфичное к белку мыши (к 252SPFFKSTSQGAQ263, SEQ ID NO: 4), и анти-RDH12 моноклональное антитело мыши (2C9), специфичное к белку человека (к C-284DCKRTWVSPRARNNKT299; SEQ ID NO: 5) (Kurth et al. 2007); анти-RHO моноклональное антитело мыши (1D4) (MacKenzie et al. 1984); анти-RHO поликлональное антитело кролика, полученное к денатурированному белку; и поликлональное антитело кролика к красному/зеленому опсину колобочек (Millipore кат. № AB5405).

Анализ иммуноблоттингом.

Белки в гомогенатах сетчатки разделяли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, переносили на нитроцеллюлозные мембраны, которые затем блокировали, инкубировали с первичным антителом в течение ночи, промывали, инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с щелочной фосфатазой, и проводили определение с использованием 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат п-толуидин и нитросиний хлорид тетразолия.

Гистология и иммунофлюоресценция.

Мышей умерщвляли, оценивали ориентацию глаз, затем их энуклеировали. Для криосрезов хрусталик и передние сегменты были удалены, глаза быстро фиксировали 4% параформальдегидом, промывали ФСБ, переносили в сахарозу/ОКТ, мгновенно замораживали и делали срезы толщиной 10 мкм. Для подготовки криозамещения целые глаза мгновенно замораживали в изопентане, охлажденном сухим льдом, в течение 30 с а затем переносили в метанол, охлажденный сухим льдом, содержащий 3% ледяной уксусной кислоты. Глаза инкубировали при 80°C в течение 48 ч, затем в течение ночи при -20°C, погружали в парафин и делали срезы толщиной 6 мкм. Парафиновые срезы депарафинизировали, и получали ан-

тигены путем инкубации в 1 мМ ЭДТА, 0,05% Твин 20, pH 8,0, при 90°C в течение 30 мин перед иммуномечением, как указано ниже. Вкратце, поперечные срезы сетчатки промывали ФСБ и просачивали ФСБ-Т (0,3% Triton X-100); блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином, 10% нормальной козьей сывороткой и 0,3% Тритон X-100; и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C, промывали, затем инкубировали с конъюгированными с флуорофором вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы накрывали покровным стеклом с использованием гелевой гистологической среды ProLong Gold, содержащей 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI; Invitrogen), и визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6000.

Запись ЭРГ.

ЭРГ выполняли, как описано ранее (Thompson, 2012), с использованием системы записи Espion e2 (Diagnosys, Лоуэлл, Массачусетс). Вкратце, мышей адаптировали к темноте в течение ночи и анестезировали внутрибрюшинной инъекцией кетамина (93 мг/кг) и ксилазина (8 мг/кг). Зрачки расширяли местным применением тропикамида (0,5%). Температуру тела поддерживали при 37°C с помощью электрогрелки. ЭРГ роговицы записывали для обоих глаз с использованием петель из золотой проволоки с местной анестезией 0,5% тетракаином и каплей 2% метилцеллюлозы для гидратации роговицы. Золотая проволоочная петля, помещенная во рту, использовалась в качестве контроля, а заземляющий электрод был на хвосте. Протокол ЭРГ состоял из регистрации адаптированных к темноте (сумеречных) реакций на короткие белые вспышки ($-2,31 \log \text{кд.с.м}^{-2}$ для В-волн только палочек; $1,09 \log \text{кд.с.м}^{-2}$ для А- и В-волн комбинированных палочек-колбочек). Адаптированные к свету (дневные) ЭРГ записывали через 10 мин после адаптации к белому фону $32 \log \text{кд.с.м}^{-2}$, подавляющему палочки, в ответ на вспышки с интенсивностью $1,09 \log \text{кд.с.м}^{-2}$ (для В-волн только колбочек). Ответы усиливали с кратностью 1000 при 1,25-1000 Гц, и оцифровывали при частоте 2000 Гц. Для удаления шума линии 60 Гц был использован режекторный фильтр. Ответы усреднялись с помощью компьютера и записывались с интервалами от 3 до 60 с в зависимости от интенсивности стимула. Для статистического анализа использовали двусторонний t-критерий Стьюдента, чтобы определить, значительно ли отличались амплитуды ЭРГ обработанных глаз от необработанных.

Анализ индуцированного светом повреждения.

Мышам-альбиносам $Rdh12^{-/-}$ инъецировали в один глаз AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг), или сопоставимый объем ФСБ, и при этом контралатеральные глаза оставались неинъецированными. Через 6 недель после инъекции был проведен анализ ЭРГ и количественный анализ сумеречных ответов, как описано выше. Через неделю мышей адаптировали к темноте в течение ночи, их зрачки расширяли тропикамидом (0,5%), и затем их помещали в коробку со светом в отдельные прозрачные отсеки. Мышей подвергали воздействию 5000 люкс в течение 2 ч, а затем их возвращали в виварий (12 ч тьма/12 ч свет (<20 люкс)) на 7 дней, после чего повторяли анализ ЭРГ. Процент исходного ответа при ЭРГ, оставшегося после светового повреждения, рассчитывали для каждого глаза, и на график наносили средние значения со среднеквадратическими ошибками. Двухсторонние парные проверки по t-критерию Стьюдента использовали для определения того, значительно ли амплитуды ЭРГ в обработанных глазах отличались от необработанных глаз.

Оптическая когерентная томография.

Мышей анестезировали, а зрачки расширяли 0,5% тропикамидом. Система оптической когерентной томографии (ОКТ) в спектральной области (система Biortigen Envisu R2200 SD-OCT (Дарем, Северная Каролина, США)) с размером объемного анализа $1,4 \times 1,4$ мм была нацелена на головку зрительного нерва. Смазывающие капли Systane (Alcon) использовались на протяжении всего процесса визуализации.

Анализ содержания ретиноидов.

Полностью-транс-ретиноаль и 11-цис-ретиноаль в глазах мыши были извлечены с использованием модификации ранее описанного способа (Bligh and Dyer, 1959). Шестинедельные мыши после инъекции были адаптированы к темноте в течение ночи, затем в тускло-красном свете, подвергнуты эвтаназии путем передозировки CO_2 , и глаза были энуклеированы и заморожены в жидком N_2 . В тусклом красном свете и на льду каждый глаз гомогенизировали в 1 мл смеси хлороформ:метанол:гидроксиламин (2 М) (3:6:1) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин. Затем добавляли 200 мкл хлороформа и 240 мкл воды, и каждый образец встряхивали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Нижнюю фазу собирали, растворитель выпаривали в атмосфере азота и образец растворяли в гексане. Ретиноиды в экстрактах идентифицировали и определяли количественно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используя модуль разделения Waters Alliance и матричный фотодиодный детектор с колонкой Supelcosil LC-31 (25 см на 4,6 мм на 3 мкм), с заполнением 5% 1,4-диоксаном в гексане. Идентификация пиков была выполнена путем сравнения с временем удержания стандартных соединений и оценки максимумов длины волны. Количественный анализ выполняли путем сравнения площадей пиков при 347 и 351 нм для син- и анти-11-цис-ретиноаль оксима соответственно, и при 357 и 361 нм для син- и анти-полностью-транс-ретиноаль-оксима соответственно (Kurth et al. др. 2007).

Анализ редуцтазной активности сетчатки.

Гомогенаты сетчаток мышей анализировали на редуктазную активность сетчатки спустя 6 недель после инъекции. Адаптированных к свету мышей умерщвляли и каждую сетчатку гомогенизировали отдельно в 125 мкл 0,25 М сахарозы, 25 мМ трис-ацетата, рН 7, 1 мМ дитиотреитола. Гомогенаты центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 5 мин для удаления неразрушенных клеток, и затем супернататы обрабатывали ультразвуком с помощью микрокончикového зонда (30 раз в течение 1 с каждый) на льду. Концентрации белка определяли модификацией процедуры Лоури (Peterson et al. 1977), а уровни RDH12 оценивали вестерн-блоттингом. Подобные образцы объединяли и 20 мкг каждого объединенного лизата анализировали (в трех повторностях) в буфере, содержащем 200 мкМ полностью-транс-ретиноль и 200 мкМ НАДФН в буфере HEPES (рН 8); реакционные смеси инкубировали в течение 0-45 мин на водяной бане при 37°C (температуре реакции, которая сводила к минимуму термическую изомеризацию ретиноидных субстратов, а также инактивацию ферментов). Формирование полностью-транс-ретинола определяли количественно с помощью анализа ВЭЖХ с обычной фазой в сравнении с известными стандартами (Chrispell et al. 2009).

Пример 1. AAV-опосредованная экспрессия RDH12 человека.

Было разработано и испытано множество векторов для заместительной терапии RDH12. Оптимальная векторная конструкция RDH12 продемонстрирована на фиг. 2А. Она содержит кДНК RDH12 человека под контролем промоторного фрагмента родопсин-киназы (GRK1). Конструкцию упаковывали в серотип AAV2/5. Было продемонстрировано, что капсид AAV серотипа 5 опосредует трансдукцию фоторецепторов, но с более медленной кинетикой и менее выраженной экспрессией по сравнению с капсидом AAV8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocca et al. 2007; Leberherz et al. 2008). Экспрессию белка RDH12 человека в сетчатке мыши через 6 недель после субретинальной инъекции AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг) оценивали с использованием антител, специфичных к Rdh12 мыши или белкам RDH12 человека. Обусловленные вектором уровни RDH12 человека, по-видимому, примерно сопоставимы с количеством Rdh12 мыши (фиг. 2В). Непрямая иммунофлуоресцентная визуализация на срезах сетчатки была использована для оценки нативного Rdh12 мыши и рекомбинантного RDH12 человека с использованием видоспецифических антител. Локализация эндогенного и рекомбинантного RDH12, по-видимому, идентична, что указывает на то, что белок процессируется нормально (фиг. 2С).

Способность сетчатки мышей Rdh12^{-/-} уменьшать уровни экзогенных ретинольдегидов значительно снижена по сравнению с мышами дикого типа (Chrispell et al. 2009). Спустя шесть недель после субретинальной инъекции мышам Rdh12^{-/-} $1,3 \times 10^9$ вг AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, анализировали гомогенаты сетчатки на *in vitro* редуктазную активность сетчатки. Формирование полностью-транс-ретинола определяли количественно с использованием анализа ВЭЖХ с обычной фазой. Каждая точка на графике представляет собой среднее \pm среднеквадратическая ошибка для минимум 5 независимых экспериментов, где сетчатки из от 3 до 5 мышей объединяли и анализировали в трех повторностях. Начальные скорости формирования полностью-транс-ретинола в сетчатках из неинъецированных мышей Rdh12^{-/-} и C57BL/6J составляли 0,013 пмоль мин⁻¹ мкг белка⁻¹, и 0,071 пмоль мин⁻¹ мкг белка⁻¹, соответственно (фиг. 3А). Остаточная активность, присутствующая у мышей Rdh12^{-/-}, отражает присутствие других изоформ RDH, которые способны уменьшать уровни полностью-транс-ретинола (Rattner et al. 2000; Haeseleer et al. 2002). У мышей Rdh12^{-/-}, инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, скорость формирования полностью-транс-ретинола, составляющая 0,046 пмоль мин⁻¹ мкг белка⁻¹ была значительно больше чем у мышей Rdh12^{-/-}, инъецированных ФСБ (0,016 пмоль мин⁻¹ мкг белка⁻¹). Восстановление редуктазной активности сетчатки (около 50%) согласуется с частичной трансдукцией сетчатки (около 30%) и указывает на то, что вектор восстанавливает обычные уровни активности в трансдуцированных фоторецепторах. Трансген экспрессировался в течение 12 месяцев (наиболее длительный исследованный момент времени). Иммунофлуоресцентное мечение продемонстрировало степень трансдукции сетчатки и рекомбинантной экспрессии RDH12 у мыши Rdh12^{-/-}, оцененные спустя 16 недель после инъекции, покрывающие примерно одну треть поверхности сетчатки (фиг. 3В).

Влияние AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 на чувствительность к повреждениям, вызванным светом, оценивали на мышах-альбиносах Rdh12^{-/-}, которым инъецировали в один глаз $1,3 \times 10^9$ вг или равный объем ФСБ, и которые не получали лечения для контралатерального глаза. Анализ ЭРГ сумеречной активности сетчатки (отдельно для палочек и комбинированно для палочек-колбочек) проводили за 1 неделю до и спустя 1 неделю после воздействия на мышей уровней света, которые вызывают значительное повреждение сетчатки у животных-альбиносов (5000 люкс в течение 2 ч). Процент активности сетчатки, остающейся в обработанных вектором глазах, был значительно выше, чем оставшийся в необработанных глазах ($p \leq 0,0168$) (фиг. 4). Напротив, у контрольных животных, которым инъецировали ФСБ, процент сумеречной активности сетчатки, остающейся в неинъецированных глазах, не был значительно выше, чем в необработанных глазах ($p \geq 0,2255$). Эти данные согласуются с опосредованной AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 защитой от повышенной чувствительности к вызванному светом повреждению, связанной с дефектом RDH12.

Токсичность вектора оценивали по прямому влиянию активности RDH12 человека на метаболизм ретиноидов и по косвенным воздействиям на структуру и функцию сетчатки, как описано в следующем

абзаце.

Широкая субстратная специфичность RDH12, которая позволяет уменьшить уровни как 11-цис-ретинала, так и полностью-транс-ретинала, создает потенциал для сверхэкспрессии или неправильной локализации рекомбинантного белка, что негативно влияет на функцию цикла превращений родопсина. ВЭЖХ-анализ содержания ретиноидов использовали для оценки активности цикла превращений родопсина в глазах мышей *Rdh12^{-/-}*, которым инъецировали AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, или ФСБ, или неинъецированных контролей C57BL/6J. Анализ ретиноидов через 6 недель после субретинальной инъекции AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг) мышам *Rdh12^{-/-}* продемонстрировал, что экспрессия hRDH12 не влияет значительно на установившиеся уровни 11-цис-ретинала в сетчатке (фиг. 5А). Иллюстративная хроматограмма демонстрирует различные контроли с указанным временем элюирования для различных ретиноидов. Общие уровни 11-цис-ретинала и полностью-транс-ретинала представляют собой средние значения \pm среднеквадратическая ошибка для минимум 5 независимых экспериментов (фиг. 5В, С). Ответы ЭРГ активности сетчатки были измерены у мышей C57BL/6J и *Rdh12^{-/-}*, которые получили $1,3 \times 10^9$ вг AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 и содержались в виварии (12 ч тьма/12 ч свет (<20 lux)). Сумеречные (только для палочек, стимул $-2,3 \log$ кд.с.м⁻²), комбинированные для палочек-колбочек (стимул $1,09 \log$ кд.с.м⁻² стимул), и дневные (реакции, опосредованные колбочками, стимул $1,09 \log$ кд.с.м⁻²) ЭРГ от репрезентативного животного в каждой группе лечения, измеренные спустя 6 недель после инъекции, не продемонстрировали значительного влияния экспрессии RDH12 человека на функцию сетчатки (фиг. 6).

Неправильная локализация родопсина и опсина колбочек является хорошо охарактеризованным показателем снижения жизнеспособности фоторецепторных клеток (Adamian et al. 2006; Tumeu et al. 2007; Brunner et al. 2010; Lopes et al. 2010). Иммуногистохимическую локализацию родопсина и красного/зеленого опсина оценивали у мышей *Rdh12^{-/-}*, неинъецированных или инъецированных AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 ($1,3 \times 10^9$ вг). У мышей, демонстрирующих устойчивую экспрессию трансгена, не наблюдали снижения уровней экспрессии опсина или признаков неправильной локализации опсина палочек и колбочек спустя 16 недель после обработки; структура сетчатки оставалась нетронутой спустя 54 недели после инъекции (фиг. 7).

Анализ с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) мышей C57BL/6J и *Rdh12^{-/-}*, оцененных спустя 54 недели после введения AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (2×10^9 вг), не выявил серьезных изменений в отслоении сетчатки на широкой площади, включая обе стороны зрительного нерва. Структура сетчатки была стабильной в течение по меньшей одного года после инъекции при сравнении с неинъецированными контралатеральными глазами (фиг. 8).

Пример 2. Повреждение сетчатки, вызванное AAV2/8.

Повреждение сетчатки у мышей, инъецированных AAV2/8-hGRK1p.hRDH12.

Продемонстрировано, что капсид, полученный из серотипа AAV 8, обеспечивает эффективную и надежную трансдукцию фоторецепторных клеток (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013). Первоначальные исследования проводили с серотипом AAV2/8, несущим векторную конструкцию, описанную выше. Мышей *Rdh12^{-/-}* обрабатывали с помощью субретинальной инъекции AAV2/8-hGRK1p.hRDH12 в дозах 10⁹-10¹⁰ вирусных геномов (вг), что в результате давало устойчивую экспрессию рекомбинантного белка RDH12 человека. Однако в инъецированных глазах возникло значительное повреждение сетчатки, начавшееся уже спустя 3 недели после инъекции и почти во всех случаях спустя 6 недель после инъекции. Инфильтрация макрофагов наблюдалась в большинстве случаев вследствие наличия клеток CD68⁺ (фиг. 9). Повреждение сетчатки не смягчалось системным введением мышам *Rdh12^{-/-}* циклоспорина (Borel et al. 1976), непрерывно с раннего возраста до момента усыпления, что указывает на то, что иммунные ответы против вектора или трансгена не были причиной, вызывающей повреждение. Эта версия согласуется с результатами, полученными для мышей дикого типа C57BL/6J, которым инъецировали конструкции, кодирующие либо RDH12 человека (AAV2/8-hGRK1p.hRDH12), либо *Rdh12* мыши (AAV2/8-hGRK1p.mRdh12), у которых значительное истончение сетчатки и инфильтрация макрофагов также произошла спустя 6 недель после инъекции.

Список литературы

- ADAMIAN M, PAWLYK BS, HONG DH, BERSON EL. (2006). Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene. *Am J Ophthalmol* 142, 515-8.
- ACLAND GM, AGUIRRE GD, RAY J, ZHANG Q, et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-5.
- ALEXANDER JJ, UMINO Y, EVERHART D, CHANG B, et al. (2007). Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 13, 685-7.
- ALI RR, SARRA GM, STEPHENS C, ALWIS MD, et al. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25, 306-10.
- ALLOCCA M, MUSSOLINO C, GARCIA-HOYOS M, SANGES D, et al. (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 81, 11372-80.
- BAINB RIDGE JW, SMITH AJ, BARKER SS, ROBBIE S, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-9.
- BELTRAN WA, CIDECIYAN AV, LEWIN AS, IWABE S, et al. (2012). Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2132-7.
- BEN-SHABAT S, PARISH CA, HASHIMOTO M, LIU J, et al. (2001). Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1533-40.
- BELYAEVA OV, KORKINA OV, STETSENKO AV, KIM T, et al. (2005). Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry* 44, 7035-47.
- BLIGH EG, DYER WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-7.
- BOREL JF, FEURER C, GUBLER HU, STÄHELIN H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-75.
- BRUNNER S, SKOSYRSKI S, KIRSCHNER-SCHWABE R, KNOBELOCH KP, et al. (2010). Cone versus rod disease in a mutant Rpgpr mouse caused by different genetic backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1106-15.
- CARLSON NB, KURTZ D, HEATH DA, HINES C. in: *Clinical Procedures for Ocular Examination*. 3rd Ed. Appleton & Lange, Norwalk, CT; 1990:63-77.
- CHEN C, THOMPSON DA, KOUTALOS Y. (2012). Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *J Biol Chem*, 287, 24662-70.
- CHEN Y, OKANO K, MAEDA T, CHAUHAN V, et al. (2012). Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J*

Biol Chem 287, 5059-69.

CHRISPELL JD, FEATHERS KL, KANE MA, KIM, CY, et al. (2009). Rdh12 activity and effects on retinoid processing in the murine retina. *J Biol Chem* 284, 21468-77.

CIDECIYAN AV, ALEMAN TS, BOYE SL, SCHWARTZ SB, et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15112-7.

DEN HOLLANDER AI, ROEPMAN R, KOENEKOOP RK, CREMERS FP. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.

FLOTTE TR, SOLOW R, OWENS RA, AFIONE S, et al. (1992). Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 349-56.

FLOTTE TR, AFIONE SA, SOLOW R, DRUMM ML, et al. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268, 3781-90.

HAESELEER F, JANG GF, IMANISHI Y, DRIESSEN CA, et al. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* 277, 45537-46.

HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6466-70.

JANECKE AR, THOMPSON DA, UTERMANN G, BECKER C, et al. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 36, 850-854.

JOHNSON DD. *Deafness and Vision Disorders: Anatomy and Physiology, Assessment Procedures, Ocular Anomalies, and Educational Implications*, Charles C. Thomas Publisher; 1999.

KELLER B, ADAMSKI J. (2007). RDH12, a retinol dehydrogenase causing Leber's congenital amaurosis, is also involved in steroid metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 190-4.

KHANI SC, PAWLYK BS, BULGAKOV OV, KASPEREK E, et al. (2007). AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3954-61.

KOENEKOOP RK. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49, 379-98.

KOMAROMY AM, ALEXANDER JJ, ROWLAN JS, GARCIA MM, et al. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 19, 2581-93.

KUMARAN N, MOORE AT, WELEBER RG, MICHAELIDES M. (2017). Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol* 101, 1147-1154.

KURTH I, THOMPSON DA, RÜTHER K, FEATHERS KL, et al. (2007). Targeted

disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function. *Mol Cell Biol* 27, 1370-9.

LEBHERZ C, MAGUIRE A, TANG W, BENNETT J, et al. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med* 10, 375-82.

LEE SA, BELYAEVA OV, KEDISHVILI NY. (2008). Effect of lipid peroxidation products on the activity of human retinol dehydrogenase 12 (RDH12) and retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1782, 421-5.

LHERITEAU E, LIBEAU L, STIEGER K, DESCHAMPS JY, et al. (2009). The RPRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Mol Vis* 15, 349-61.

LOPES VS, JIMENO D, KHANOBDEE K, SONG X, et al. (2010). Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death. *Mol Biol Cell* 21, 4076-88.

LOTERY AJ, YANG GS, MULLINS RF, RUSSELL SR, et al. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14, 1663-71.

MACKAY DS, DEV BORMAN A, MORADI P, HENDERSON RH, et al. (2011). RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Mol Vis* 17, 2706-16.

MAEDA A, MAEDA T, IMANISHI Y, SUN W, et al. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol Chem* 281, 37697-704.

MAGUIRE AM, SIMONELLI F, PIERCE EA, PUGH EN, JR., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-8.

MARCHETTE LD, THOMPSON DA, KRAVTSOVA M, NGANSOP TN, et al. (2010). Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxynonenal in photoreceptor cells. *Free Radic Biol Med* 48, 16-25.

MCLAUGHLIN SK, COLLIS P, HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62, 1963-73.

MACKENZIE D, ARENDT A, HARGRAVE P, MCDOWELL JH, et al. (1984). Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides. *Biochemistry* 23, 6544-9.

MACLAREN RE, GROPE M, BARNARD AR, COTTRIAL CL, et al. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 383, 1129-37.

MUZYCZKA N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129.

NATKUNARAJAH M, TRITTIBACH P, MCINTOSH J, DURAN Y, et al. (2008). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther* 15, 463-7.

NISHIGUCHI KM, CARVALHO LS, RIZZI M, POWELL K, et al. (2015). Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in *Gpr179*. *Nat Commun* 6, 6006. PANG JJ, LEI L, DAI X, SHI W, et al. (2012). AAV-mediated gene therapy in

mouse models of recessive retinal degeneration. *Curr Mol Med* 12, 316-30.

PAWLYK BS, SMITH AJ, BUCH PK, ADAMIAN M, et al. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3039-45.

PAWLYK BS, BULGAKOV OV, LIU X, XU X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 21, 993-1004.

PERRAULT I, HANEIN S, GERBER S, BARBET F, et al. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 75, 639-46.

PETERSON GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-56.

RATTNER A, SMALLWOOD PM, NATHANS J. (2000). Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem* 275, 11034-43.

SAMULSKI RJ, CHANG LS, SHENK T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63, 3822-8.

SCHUSTER A, JANECKE AR, WILKE R, SCHMID E, et al. (2007). The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1824-31.

SPARROW JR. (2010). Bisretinoids of RPE lipofuscin: trigger for complement activation in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 703, 63-74.

SUN X, PAWLYK B, XU X, LIU X, et al. (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther* 17, 117-31.

TAN MH, SMITH AJ, PAWLYK B, XU X, et al. (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1 : effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet*.

THOMPSON DA, GAL A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22, 683-703.

THOMPSON DA, JANECKE AR, LANGE J, FEATHERS KL, et al. (2005). Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet* 14, 3865-75.

THOMPSON DA, KHAN NW, OTHMAN MI, CHANG B, et al. (2012). Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15. *PLoS One* 7, e35865.

TRATSCHIN JD, WEST MH, SANDBANK T, CARTER BJ. (1984a). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and

encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4, 2072-81.

TRATSCHIN JD, MILLER IL, CARTER BJ. (1984b). Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51, 611-9.

TRATSCHIN JD, MILLER IL, SMITH MG, CARTER BJ. (1985). Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5, 3251-60.

TURNEY C, CHONG NH, ALEXANDER RA, HOGG CR, et al. (2007). Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4240-9.

VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, CEARLEY CN, et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3, 88ra54.

VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, XIAO R, et al. (2013). AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. *PLoS One* 8, e53463.

XIAO X, LI J, SAMULSKI RJ. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72, 2224-32.

YANG GS, SCHMIDT M, YAN Z, LINDBLOOM JD, et al. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 76, 7651-60.

YOUNG JE, VOGT T, GROSS KW, KHANI SC. (2003). A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4076-85.

WELEBER RG, FRANCIS PJ, TRZUPEK KM, BEATTIE C. (2004). Leber Congenital Amaurosis. In: PAGON RA, ADAM MP, ARDINGER HH, WALLACE SE, et al. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. [updated 2013 May 2].

WONDISFORD FE, USALA SJ, DECHERNEY GS, CASTREN M, et al. (1988). Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol Endocrinol* 2, 32-9.

Каждый из источников, процитированных в данном документе, тем самым включен посредством ссылки в полном объеме или как соответствующая часть, что будет очевидно из контекста цитирования.

Следует понимать, что хотя заявленный объект изобретения был описан вместе с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема данного заявленного объекта изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта-человека, который имеет офтальмологическую патологию вследствие одной или более мутаций с потерей функции в гене, кодирующем белок ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12), включающий введение в по меньшей мере один глаз субъекта аденоассоциированного вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота содержит ДНК RDH12 человека, и причем ДНК RDH12 человека кодирует белок, который по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 2, причем аденоассоциированный вирусный вектор представляет собой AAV-2, серотип-5 (AAV2/5), и

в котором офтальмологическая патология представляет собой врожденный амавроз Лебера (ВАЛ).

2. Способ по п.1, в котором ДНК RDH12 находится под экспрессионным контролем промотора родопсин-киназы 1 (hGRK1) человека.

3. Способ по п.2, в котором промотор hGRK1 содержит SEQ ID NO: 3.

4. Способ по п.3, в котором промотор hGRK1 по существу состоит из SEQ ID NO: 3.

5. Способ по п.1, в котором ДНК RDH12 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60 или 70% идентична SEQ ID NO: 1.

6. Способ по п.1, включающий введение нуклеиновой кислоты в титре от приблизительно 2×10^{10} вирусных геномов на миллилитр (вг/мл) до приблизительно 2×10^{12} вг/мл.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором нуклеиновую кислоту вводят в субретинальное пространство.

8. Способ по п.7, в котором в субретинальное пространство вводят микроинъекционную канюлю.

9. Способ по п.1, в котором ДНК RDH12 человека кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 2, и в котором ДНК RDH12 находится под контролем экспрессии промотора родопсин-киназы 1 человека (hGRK1), причем промотор hGRK1 по существу состоит из SEQ ID NO: 3.

10. Аденоассоциированный вирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую ДНК RDH12 человека, где ДНК RDH12 человека кодирует белок, который по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% идентичен полноразмерной SEQ ID NO: 2, где ДНК RDH12 находится под контролем промотора родопсин-киназы 1 человека (hGRK1), и где аденоассоциированный вирусный вектор представляет собой AAV-2, серотип-5 (AAV2/5).

11. Аденоассоциированный вирусный вектор по п.10, в котором промотор hGRK1 содержит SEQ ID NO: 3.

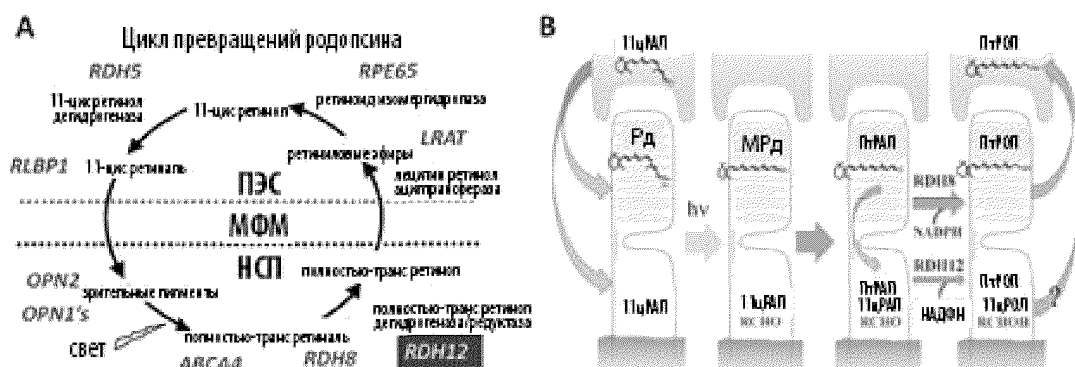
12. Аденоассоциированный вирусный вектор по п.10, в котором ДНК RDH12 человека кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 2.

13. Аденоассоциированный вирусный вектор по любому из пп.10-12, в котором промотор hGRK1 по существу состоит из SEQ ID NO:3.

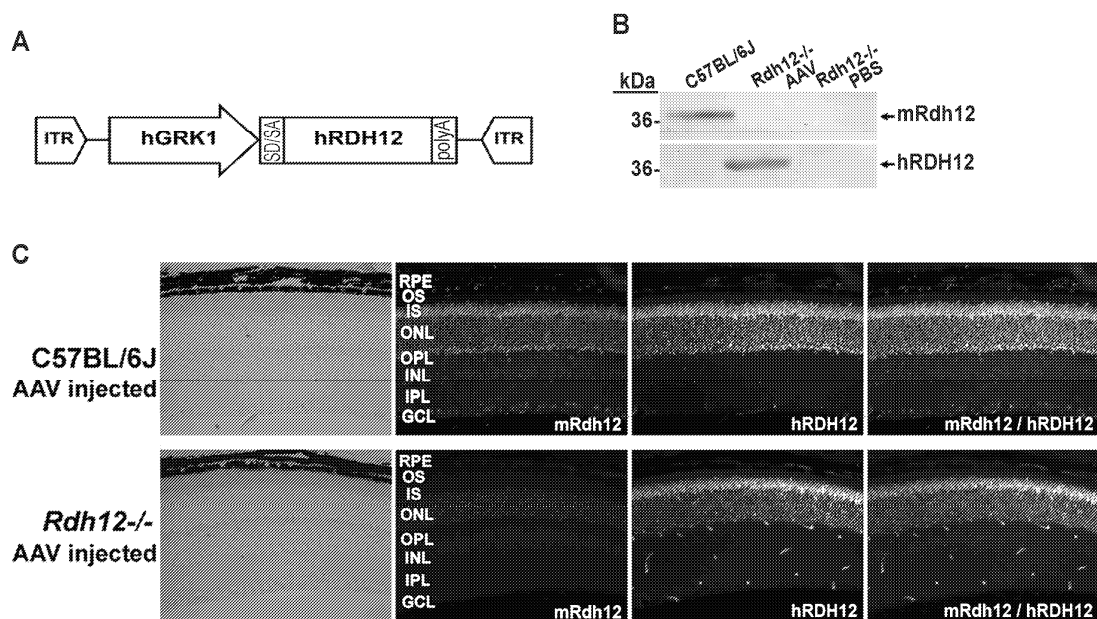
14. Аденоассоциированный вирусный вектор по п.10, в котором ДНК RDH12 человека по меньшей мере на 60 или 70% идентична полноразмерной SEQ ID NO: 1.

15. Выделенная клетка-хозяин, содержащая аденоассоциированный вирусный вектор по любому из пп.10-14.

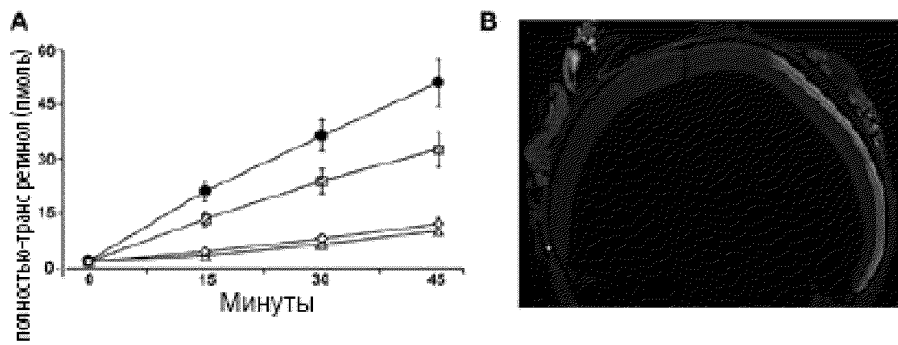
16. Выделенная клетка-хозяин по п.15, где клетка экспрессирует белок RDH12 человека.



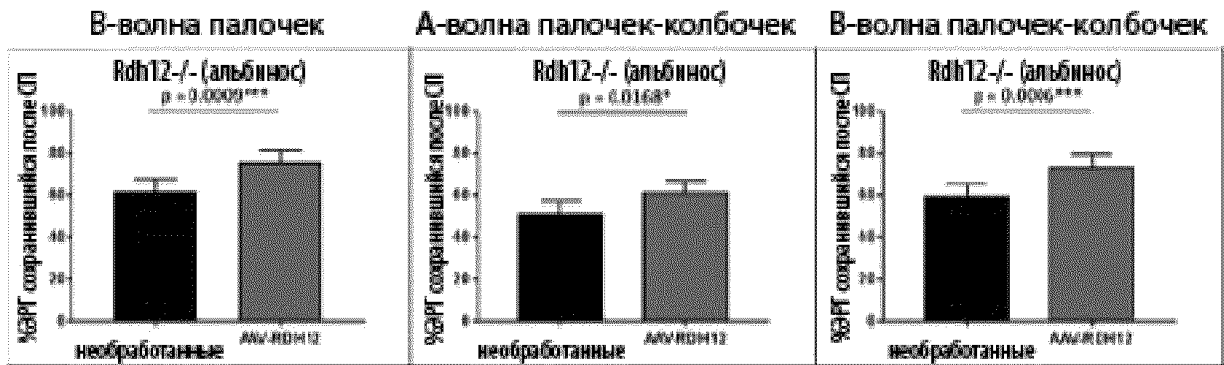
Фиг. 1



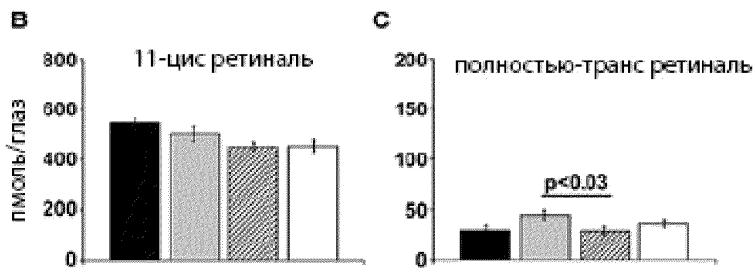
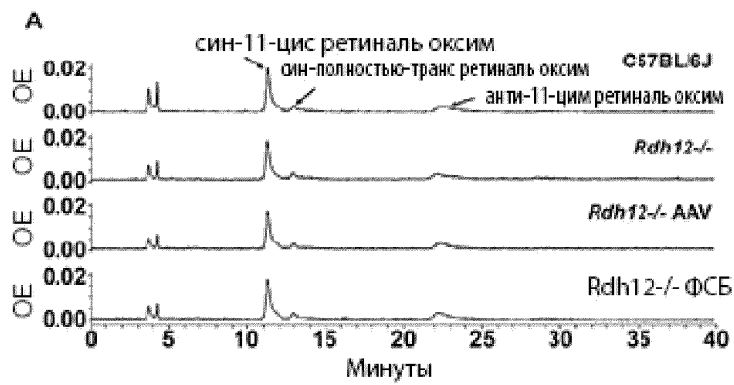
Фиг. 2



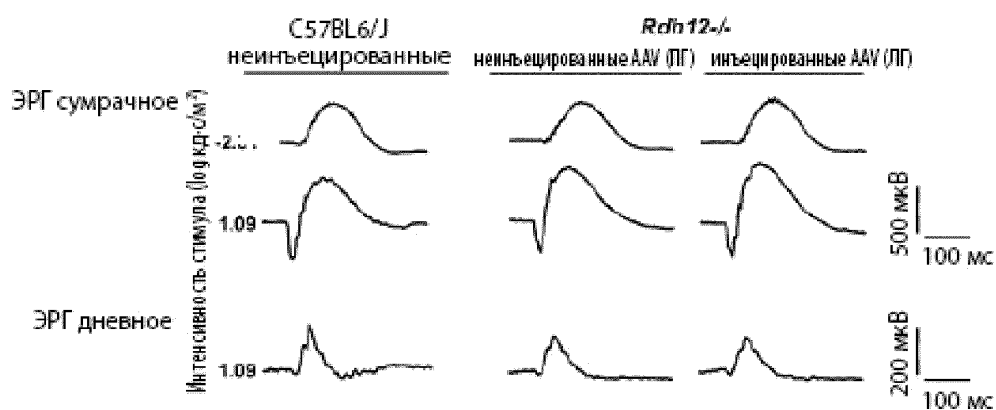
Фиг. 3



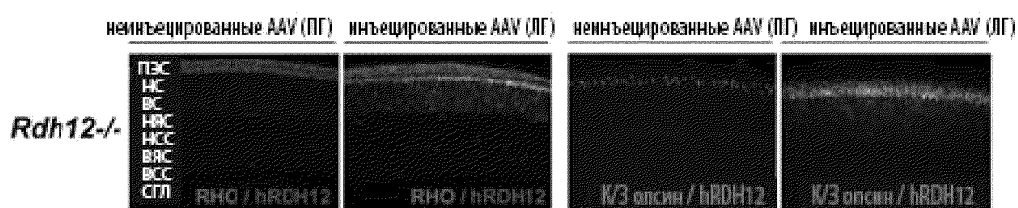
Фиг. 4



Фиг. 5



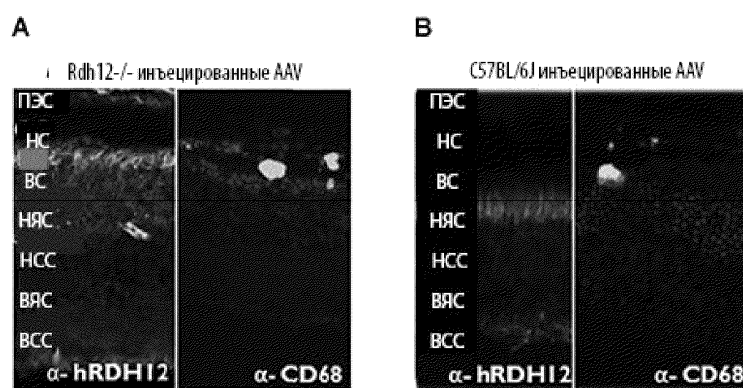
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9