

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045729**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента	(51) Int. Cl.	<i>C12N 15/67</i> (2006.01) <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/861</i> (2006.01)
2023.12.20		<i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61P 27/02</i> (2006.01) <i>C07K 14/72</i> (2006.01)
(21) Номер заявки		
202291525		
(22) Дата подачи заявки		
2020.11.18		

(54) **ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ ОН-БИПОЛЯРНЫХ КЛЕТОК,
ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ**

(31) 19209841.6	(56) WO-A1-2015138616
(32) 2019.11.18	WO-A2-2012051599
(33) EP	WO-A1-2015126972
(43) 2022.08.15	WO-A1-2015128624
(86) PCT/EP2020/082588	
(87) WO 2021/099420 2021.05.27	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: УНИВЕРЗИТЕТ БЕРН (CH)	
(72) Изобретатель: Кляйнлогель Соня, Хуллигер Эльмар Карлос (CH)	
(74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)	

(57) Настоящее изобретение относится к синтетическим промоторным последовательностям, специфическим в отношении ОН-биполярных клеток сетчатки, и к их применению в терапевтической доставке трансгенов в глаз для улучшения и/или восстановления зрения. Настоящее изобретение относится к промоторам гена метаботропного глутаматного рецептора 6 (mGluR6) для повышенной и более специфической экспрессии в ОН-биполярных клетках, в частности, в ОН-биполярных клетках макулы человека, представляющих собой колбочки.

B1

045729

045729

B1

Настоящее изобретение относится к синтетическим промоторным последовательностям, специфическим в отношении ON-биполярных клеток сетчатки, и к их применению в терапевтической доставке трансгенов в глаз для улучшения и/или восстановления зрения. Настоящее изобретение предусматривает промоторы гена метаболитного глутаматного рецептора 6 (mGluR6) для повышенной и более специфической экспрессии в ON-биполярных клетках. В частности, для эффективной экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки, присутствующих исключительно в макуле человека.

Описание

Предпосылки изобретения

Многие причины слепоты имеют лишь ограниченные возможности лечения или вообще не лечатся. Наиболее распространенными среди них являются возрастная макулярная дегенерация (AMD) и наследственные заболевания сетчатки (IRD), такие как пигментный ретинит (RP). Эти дегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей потерей фоторецепторов (PR), что в конечном итоге приводит к полной слепоте. Средства генной терапии, доставляющие лечебную ДНК или РНК, заменяющие или подвергающие сайленсингу дефектные гены или кодирующие экзогенный лечебный ген, направлены на замедление прогрессирования заболевания, снижение степени тяжести симптомов или восстановление утраченной функции.

Оптогенетическая генная терапия является одной из наиболее многообещающих новых технологий, которые могут быть использованы для лечения слепоты, вызванной дегенерацией сетчатки. Текущие клинические испытания средств оптогенетической терапии неспецифически нацеливаются на ганглиозные клетки сетчатки (RGC) с канальными родопсинами для восстановления чувствительности сетчатки к свету. В будущем оптогенетические средства генной терапии следующего поколения, адаптированные по отношению к клеткам, докажут свое превосходство над этими неспецифическими средствами терапии. В этих средствах терапии следующего поколения применяются промоторы, специфические в отношении типа клеток, для доставки новых и эффективных оптогенетических инструментов к определенным типам клеток сетчатки. Среди мишеней из типов клеток наиболее многообещающими являются биполярные клетки сетчатки (BC), первые интернейроны сетчатки, которые естественным образом получают прямой входной сигнал от PR. BC делятся на BC ON- и OFF-типа, реагирующие либо на повышение освещенности, либо на снижение освещенности соответственно, и экспрессирующие либо mGluR6, либо AMPA/каинатные глутаматные рецепторы. ON-биполярные клетки (OBC) являются особенно интересными мишенями для генной терапии. Все мутации в специфических генах OBC, таких как NYX, GRM6, GPR179 или TRPM1, приводят к полной слепоте (врожденной стационарной ночной слепоте), поскольку эти гены участвуют в сигнальном каскаде mGluR6, и, следовательно, OBC становятся нефункциональными. Совсем недавно было доказано, что экспрессия оптогенетических белков в OBC восстанавливает зрение у мышей, представляющих собой модели фоторецепторной дегенерации, страдающих от поздних стадий дегенерации. Канальный родопсин-2 (Lagali et al., *Nat Neurosci* 2008. 11:p. 667-675), родопсин (Сehajic-Karpetanovic et al., *Curr Biol* 2015. 25 : p. 2111-2122) и химерный Opto-mGluR6 (van Wyk et al., *PLoS Biol* 2015. 13: p. e1002143) были успешно экспрессированы в OBC слепых мышей и восстановили функциональное зрение на уровнях сетчатки, коры, а также на поведенческом уровне. Для всех вышеупомянутых подходов необходимо специфически нацеливаться на тип OBC, в частности в случае оптогенетических подходов, чтобы избежать противоречивой передачи сигнала от нецелевых клеток, искажающей код сетчатки. Кроме того, специфическое нацеливание на OBC также позволяет снизить и таким образом сделать более безопасной дозировку AAV. Отсутствие функционального и OBC-специфического промотора до сих пор препятствовало клиническому применению средств генной терапии, нацеливающихся на OBC.

Короткие энхансерные промоторные последовательности обычно использовались в данной области для достижения OBC-специфического нацеливания в комбинации со средством генной терапии на основе AAV. Это связано с тем, что способность AAV к упаковке ограничена 4,7 т.п.о. и обычно не позволяет вместить эндогенные промоторы длиной несколько т.п.о. В этом отношении наиболее успешными оказались энхансерные промоторные последовательности, полученные из OBC-специфического глутаматного рецептора mGluR6, экспрессируемого исключительно в OBC сетчатки. До недавнего времени стандартно использовали энхансерную последовательность длиной 200 п.о., полученную из мышинового гена *Grm6*, и в комбинации с вирусным основным промотором SV40 (Kim et al. *J Neurosci*, 2008. 28: p. 7748-7764.), сокращенно обозначенную 200En-SV40. Однако недавно авторы настоящего изобретения показали, что ее вариант, 4×200En-SV40, который несет четыре повтора энхансерной последовательности (Cronin et al. *EMBO Mol Med* 2014. 6: p. 1175-1190), не является ни OBC-специфическим, ни функциональным при дегенерации сетчатки поздней стадии (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. 11: p. 161). Совсем недавно был сконструирован короткий энхансер/промотор на основе полноразмерного мышинового гена *Grm6* (200En-mGluR500P), который экспрессируется в сетчатке мышей C57BL/6 дикого типа с относительно хорошей специфичностью в отношении OBC (Lu et al. *Gene Ther*, 2016. 23: p. 680-9.). Тем не менее, экспрессия в OBC дегенерирующей сетчатки не была показана, и экспрессия была практически исключительно обусловлена OBC типа палочек. Следовательно, OBC типа колбочек, обнаруженные исключительно в маку-

ле сетчатки фовеальных животных, включая человека, и соединяющиеся с фовеальными колбочками, опосредующими цветное зрение высокой остроты, практически не являются мишенями для 200EpmGluR500P, что делает данный промотор непригодным для восстановления центрального зрения человека высокой остроты. Кроме того, предпочтителен промотор на основе человеческого гена GRM6, поскольку он будет полностью контролироваться транскрипционным механизмом человека, регулирующим экспрессию генов, т.е. экспрессию уровней белков, опосредующих функцию, но будет лишен индукции цитотоксичности.

Основываясь на вышеупомянутом уровне техники, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы обеспечить средства и способы получения новых синтетических ОВС-специфических человеческих промоторов. Данная цель достигается с помощью объекта изобретения согласно независимым пунктам формулы настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащей:

- а) элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- б) элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащей:

- а) элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше), в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и
- б) элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Второй аспект настоящего изобретения относится к вектору экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Третий аспект настоящего изобретения относится к трансгену, управляемому промотором.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вирионной частице аденоассоциированного вируса, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту или трансген согласно третьему аспекту.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, для применения в качестве лекарственного препарата.

Формы для введения, содержащие средства по настоящему изобретению, являются дополнительными аспектами настоящего изобретения.

Термины и определения.

Термин ОВС в контексте настоящего описания относится к ON-биполярной клетке.

Термин RBC в контексте настоящего описания относится к биполярной клетке, представляющей собой палочку.

Термин сОВС в контексте настоящего описания относится к ON-биполярной клетке, представляющей собой колбочку.

Термин RGC в контексте настоящего описания относится к ганглиозной клетке сетчатки.

Термин PR в контексте настоящего описания относится к фоторецептору.

Аббревиатура AAV в контексте настоящего описания относится к аденоассоциированному вирусу. Если не указано иное, AAV относится ко всем подтипам или серотипам, а также к обеим из способных к репликации и рекомбинантных форм.

Термины вирион AAV и вирусная частица AAV в контексте настоящего описания относятся к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсулированной нуклеиновой кислоты.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техни-

ки (например, в культивировании клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, методиках гибридизации и биохимии). Стандартные методики используются для молекулярных, генетических и биохимических способов (см. в общем Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.), а также химических способов.

Термин капсид AAV в контексте настоящего описания относится к синтетическим генам, кодирующим капсидные белки (cap). Описанный в данном документе термин капсид AAV можно использовать в отношении упаковки в рекомбинантные аденоассоциированные вирусы для генной терапии.

Термин "гомологичный" в контексте настоящего описания относится к последовательностям, большая часть которых является идентичной, но отличается в некоторых положениях наличием вставки, делеции или замены нуклеиновых кислот или аминокислот.

Термин "трансен" в контексте настоящего описания относится к гену или генетическому материалу, который был перенесен из одного организма в другой. В контексте настоящего изобретения данный термин также может относиться к переносу природного или физиологически интактного варианта генетической последовательности в ткань пациента, где она отсутствует. Это может дополнительно относиться к переносу природной кодированной последовательности, экспрессия которой управляется промотором, отсутствующим или подвергнутому сайленсингу в целевой ткани. Используемый в данном документе термин "трансен" относится к полинуклеотиду, кодирующему представляющий интерес полипептид, который при экспрессии в поврежденной или пораженной заболеванием сетчатке может быть пригоден для улучшения или восстановления зрения. Трансены, представляющие особый интерес для восстановления светочувствительности или зрения, предусматривают светочувствительные белки, такие как гены опсинов, т.е. канальных родопсинов, опсинов позвоночных и их вариантов.

Термин "рекомбинантный" в контексте настоящего описания относится к нуклеиновой кислоте, которая является продуктом одной или нескольких стадий клонирования, рестрикции и/или лигирования и которая отличается от встречающейся в природе нуклеиновой кислоты. Рекомбинантная вирусная частица содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту.

Термин "интравитреальное введение" в контексте настоящего описания относится к пути введения фармацевтического средства, например, вируса, при котором средство доставляется в стекловидное тело глаза. Интравитреальное введение представляет собой процедуру помещения лекарственного препарата непосредственно в пространство в задней части глаза, называемое полостью стекловидного тела, которая заполнена желеобразной жидкостью, называемой гелем стекловидного тела.

Термин субретинальное введение в контексте настоящего описания относится к пути введения фармацевтического средства, в частности вируса в контексте данного описания, в пространство между клетками пигментного эпителия сетчатки (RPE) и фоторецепторами.

"Нуклеотиды" в контексте настоящего описания представляют собой строительные блоки нуклеиновой кислоты или аналогов нуклеиновой кислоты, олигомеры которых способны к образованию селективных гибридов с олигомерами РНК или ДНК на основе спаривания оснований. Термин "нуклеотиды" в данном контексте включает классические строительные блоки рибонуклеотидов, представляющие собой аденозин, гуанозин, уридин (и рибозилтимин), цитидин, классические дезоксирибонуклеотиды, представляющие собой дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, тимидин, дезоксиуридин и дезоксицитидин.

В контексте настоящего описания термины идентичность последовательностей и "процент идентичности последовательностей" относятся к значениям, определенным посредством сравнения двух выровненных последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны из уровня техники. Выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита и Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритма глобального выравнивания Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), способа поиска сходства Пирсона и Липмана, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:2444 (1988) или посредством реализаций этих алгоритмов с помощью компьютера, включая без ограничения CLUSTAL, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным, например, через Национальный центр биотехнологической информации:

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Одним таким примером сравнения последовательностей нуклеиновых кислот является алгоритм BLASTN, использующий настройки по умолчанию: ожидаемый порог: 10; размер слова: 28; максимальное количество совпадений в запрашиваемом диапазоне: 0; баллы за совпадение/несовпадение: 1.-2; стоимость гэпов: линейная. Если не указано иное, приведенные в данном документе значения идентичности последовательностей относятся к значениям, полученным с применением пакета программ BLAST (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)) с применением идентифицированных выше установленных по умолчанию параметров для сравнения белков и нуклеиновых кислот соответственно.

В контексте настоящего описания термин "расположенный выше" относится к направлению к 5'-концу. Для энхансерных и промоторных последовательностей в данной заявке приведены одноцепочечные последовательности, и если энхансер расположен выше промотора, это означает, что энхансер расположен в 5'-направлении от промотора. Аналогично, термин "расположенный ниже" относится к на-

правлению к 3'-концу.

В контексте настоящего описания термин "спейсерная последовательность" относится к нуклеиновой кислоте переменной длины, которая используется для соединения энхансера и промотора с целью получения одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Иллюстративными вариантами осуществления линкеров, пригодных для реализации настоящего изобретения на практике, являются цепи олигонуклеиновой кислоты, состоящие из 1-1000 нуклеиновых кислот.

Специфичность в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки (сОВС), в эксплантатах сетчатки человека измеряется с применением следующего протокола.

Во-первых, промотор объединяется с репортерным трансгеном mCitrine и упаковывается в самокомплементарный (sc) вектор scAAV2(7m8) на основе AAV (Dalkara et al. Sci Transl Med 2013. 5: p. 189га76). Примерно 10^{10} vg (векторных геномов) добавляют к стороне RGC культивируемых посмертных эксплантатов сетчатки человека в день 0, как подробно описано в (van Wyk et al. Front Neurosci 2017. 11: p.161). Сетчатки фиксируются в день 7 культивирования с помощью 4% PFA и затем подвергаются крио-защите (10/20/30% сахарозы в PBS) и замораживаются. Криосрезы сетчатки три раза обрабатываются антителами к трансгену mCitrine (Invitrogen, A11122, 1:500), антителами к повсеместно встречающемуся маркеру ОВС Gαo (EMD, MAB3073, 1:750) и специфическим в отношении RBC антителом к PKCα (Santa Cruz, sc8393, 1:750). Экспрессирующие RBC идентифицируются как [mCitrine(+), PKCα(+)], тогда как клетки [mCitrine(+), PKCα(-), Gαo(+)] идентифицируются как экспрессирующие сОВС. Специфичность типа сОВС определяется по соотношению экспрессирующих сОВС и всех экспрессирующих ОВС:

$$\left[\frac{N\{mCitrine(+),PKC\alpha(-),G\alpha o(+)\}}{N\{mCitrine(+),G\alpha o(+)\}} \right] (1),$$

где N представляет собой количество клеток с характеристиками окрашивания, указанными в скобках.

Предпочтительность в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки, затем определяется следующим образом.

Количество RBC и сОВС неодинаково и варьируется в разных областях сетчатки. Эксплантаты получают из средней части и периферии сетчатки, где соотношение RBC и сОВС

$$\left[\frac{N\{PKC\alpha(+)\}}{N\{PKC\alpha(-),G\alpha o(+)\}} \right] (3)$$

является примерно постоянным на небольшом участке эксплантата. Следовательно, соотношение экспрессирующих сОВС и экспрессирующих RBC

$$\left[\frac{N\{mCitrine(-),PKC\alpha(-),G\alpha o(+)\}}{N\{mCitrine(-),PKC\alpha(+),G\alpha o(+)\}} \right] (4)$$

можно считать постоянным и в эксплантате. Это позволяет рассчитать коэффициент предпочтительности сОВС по сравнению с RBC

$$x = \frac{N\{PKC\alpha(+)\} * N\{mCitrine(+),PKC\alpha(-),G\alpha o(+)\}}{N\{PKC\alpha(-),G\alpha o(+)\} * N\{mCitrine(+),PKC\alpha(+),G\alpha o(+)\}} (5),$$

что позволяет определить специфическое распределение сОВС и RBC в эксплантате посредством умножения (3) на (4). Затем предпочтительность сОВС в процентах рассчитывается с помощью

$$\frac{100\% * x}{1+x} (6)$$

Используемый в данном документе термин "осуществление лечения" или "лечение" любого заболевания или нарушения (например, потери зрения) относится в одном варианте осуществления к снижению степени тяжести заболевания или нарушения (например, к замедлению, или остановке, или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относятся к облегчению или снижению степени тяжести по меньшей мере одного физического параметра, включая параметры, которые могут быть неявными для пациента. В еще одном варианте осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относятся к модулированию заболевания или нарушения либо физически (например, стабилизации явного симптома), либо физиологически (например, стабилизации физиологического параметра), либо к им обоим. В еще одном варианте осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относятся к введению экзогенной терапевтической функции в клетки определенного типа. Способы оценки лечения и/или предупреждения заболевания, как правило, известны из уровня техники, если только они специально не описаны в данном документе ниже.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении раскрыты энхансерные промоторные последовательности человеческого гена GRM6 с повышенной специфичностью в отношении ОВС и значительно усиленной индуцируемой в сОВС экспрессией белка по сравнению с 200En-mGluR500P в посмертной сетчатке мыши и человека. Промоторы, описанные в данном документе, состоят из промотора гена модифицированного метаболитного глутаматного рецептора 6 (mGluR6), который содержит последовательности из регуляторных элементов, которые направляют экспрессию белка mGluR6 в ОВС, в частности RBC и сОВС. Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или вектору экспрессии нуклеино-

вой кислоты, содержащим энхансер гена mGluR6 или его вариант и промотор гена mGluR6 или его вариант. Эта новая энхансерная промоторная последовательность из гена GRM6 впервые обеспечивает эффективную экспрессию трансгена в сОВС сетчатки человека, в частности в парафовеа человека. Кроме того, новые энхансерные промоторные последовательности из человеческого гена GRM6 в комбинации с оптогеном (MWOPN_mGluR6, SEQ ID NO: 16) приводили к широкому распространению ОВС-специфической экспрессии в дегенерирующей мышью (rd1, C3HHe/OuJ) сетчатке и восстановлению функционального зрения (оптомоторный ответ) у в ином случае слепых мышей с дегенерацией фоторецепторов. Новый энхансер/промотор человеческого гена GRM6 продемонстрировал высокоэффективное, обширное и специфическое нацеливание на ОВС в сетчатке мыши и человека.

Первый аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей:

- a) элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и
- b) элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащей:

- a) элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

Другая альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей:

a) элемент энхансерной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b) элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Другая альтернатива первому аспекту настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащей:

a) элемент энхансерной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b) элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

Специфичность в отношении сОВС и уровень экспрессии в сОВС измеряются, как описано выше.

Авторы настоящего изобретения показали, что комбинация SEQ ID NO 1 или 2 с SEQ ID NO 7 приводит к высокой специфичности в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, и к высокому уровню экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки. Специалист в данной области техники способен найти сходные последовательности с эквивалентной специфичностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, и уровнем экспрессии в ON-биполярных клетках, представляющих собой колбочки, на основе раскрытия настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления элемент энхансерной последовательности расположен

выше элемента промоторной последовательности.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит спейсерную последовательность длиной 1-1000 пар оснований, в частности 1-394 пар оснований. В определенных вариантах осуществления спейсер расположен между энхансером и промотором. В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит спейсерную последовательность длиной 1-1000 пар оснований, в частности 1-394 пар оснований, и спейсер расположен между энхансером и промотором.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15.

В определенных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13.

Второй аспект настоящего изобретения относится к вектору экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирусный геном.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV).

В определенных вариантах осуществления вектор на основе AAV представляет собой либо одноцепочечный вектор (ssAAV), либо самокомплементарный вектор (scAAV).

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:

- a) последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- b) трансген.

От 5'-конца к 3'-концу выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит в первую очередь энхансер, затем необязательно спейсер и затем промотор. Трансген расположен в 3'-направлении от промотора. В определенных вариантах осуществления трансгену предшествует оптимизированная последовательность КОЗАК.

Последовательность Козак содержит консенсус (gcc)gccAccAUGG (SEQ ID NO 24) или (gcc)gccGccAUGG (SEQ ID NO 25) и важна для инициации трансляции.

В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит регуляторную последовательность WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков). WPRE представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции создает третичную структуру, усиливающую экспрессию. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии нуклеиновой кислоты также содержит поли(A)-хвост, встроенный ниже трансгена. Поли(A)-хвост способствует трансляции трансгена.

В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой AAV2, AAV2(7m8) или AAV8(BP2).

Третий аспект настоящего изобретения относится к трансгену, управляемому промотором.

В определенных вариантах осуществления трансген представляет собой NYX, GRM6, GPR179 или TRPM1 для восстановления светочувствительности или зрения при врожденной стационарной ночной слепоте.

В определенных вариантах осуществления трансген содержит последовательность под SEQ ID NO 16 или существенным образом состоит из нее.

В определенных вариантах осуществления трансген представляет собой ген опсина, восстанавливающий восприятие света или зрение.

В определенных вариантах осуществления ген опсина выбран из группы, состоящей из канального родопсина, меланопсина, родопсина, опсинов колбочек, пинеального опсина, фотопсинов, галородопсина, бактериородопсина, протеородопсина, опсина медузы, опсина паука-скакуна или любого их функционального варианта или фрагмента.

В определенных вариантах осуществления ген опсина представляет собой химерный белок, полученный из опсина и метаболитного глутаматного рецептора mGluR6 из ОВС сетчатки.

В определенных вариантах осуществления химерный белок представляет собой Opto-mGluR6.

В определенных вариантах осуществления химерный белок представляет собой мышинный или человеческий MWOPN_mGluR6 (SEQ ID NO: 16).

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к вирионной частице аденоассоциированного вируса, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно

второму аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно третьему и четвертому аспектам, для применения в качестве лекарственного препарата.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту для применения в лечении состояния, поражающего биполярную клетку сетчатки.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, для применения в лечении врожденной стационарной ночной слепоты или палочко-колбочковых и колбочко-палочковой дистрофий, в частности пигментного ретинита и макулярной дегенерации.

Дополнительный аспект относится к средству, выбранному из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, трансгена согласно третьему аспекту и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно четвертому аспекту, где средство вводится посредством:

a) интравитреального введения, в частности посредством интравитреальной инъекции, или посредством

b) субретинальной инъекции.

Дополнительный аспект относится к способу лечения, при котором средство по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом пациенту.

Там, где альтернативы отдельных разделяемых признаков, таких как, например, промоторная последовательность или медицинское показание, представлены в данном документе как "варианты осуществления", следует понимать, что такие альтернативы можно свободно комбинировать для получения отдельных вариантов осуществления раскрытого в данном документе настоящего изобретения. Таким образом, любой из альтернативных вариантов осуществления промоторной последовательности можно комбинировать с любым медицинским показанием, подвергающим риску функцию ОВС, и любой средой-носителем для доставки ДНК или способом доставки ДНК, включая альтернативные вирусы, наночастицы, липосомы или доставку "голой" ДНК с применением, например, генной пушки или электропорации.

Неограничивающий перечень заболеваний сетчатки, при которых могут принести пользу описанные в данном документе способы, включает врожденную ночную слепоту, макулярную дегенерацию, возрастную макулярную дегенерацию, врожденные колбочковые дистрофии и большую группу нарушений, связанных с пигментным ретинитом (RP).

Абзацы.

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащая:

a) элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-6, и

b) элемент промоторной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 7-10.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащая:

a) элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше), в частности на 75% или больше, на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1 и 2, и

b) элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше, в частности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биполярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, в частности 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше, в частности 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно абзацу 1 или абзацу 2, где выделенная молекула состоит из одного и только одного из указанных элементов энхансерной последовательности, одного и только одного из указанных элементов промоторной последовательности и необязательно спейсера, отделяющего элемент энхансерной последовательности от элемента промоторной последовательности.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих абзацев, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15, или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 11 - SEQ ID NO 15, или состоящая из нее.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих абзацев, содержащая последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 11 или SEQ ID NO 13, или состоящая из нее, в частности содержащая последовательность под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 13, или состоящая из нее.

6. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих абзацев.

7. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно абзацу 6, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (гAAV), в частности где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12, более конкретно где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

8. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-7, дополнительно содержащий:

- a) последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- b) трансген.

9. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно абзацу 8, где трансген содержит последовательность под SEQ ID NO 16.

10. Вирионная частица аденоассоциированного вируса, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5 или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9.

11. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5 или вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10, для применения в качестве лекарственного препарата.

12. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10 для применения в лечении состояния, поражающего биполярную клетку сетчатки, в частности в лечении врожденной стационарной ночной слепоты (CSBN1) или палочко-колбочковой и колбочко-палочковой дистрофий, более конкретно пигментного ретинита и макулярной дегенерации.

13. Средство, выбранное из выделенной молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 1-5, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты согласно любому из абзацев 6-9 и вирионной частицы аденоассоциированного вируса согласно абзацу 10, где средство вводится посредством:

- a) интравитреального введения, в частности посредством интравитреальной инъекции, или посредством
- b) субретинальной инъекции.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и графическими материалами, из которых можно извлечь дополнительные варианты осуществления и преимущества. Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, но не для ограничения его объема.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Вид последовательностей человеческого гена GRM6, выбранных для конструирования промотора, в геномном браузере. (A) Дистальная энхансерная область гена GRM6 человека (расположена на расстоянии примерно - 14 т.п.о. относительно сайта начала трансляции (TLSS)), указывающая на три выбранных энхансерных элемента, включая консервативную область размером 310 п.о. между мышинным геном Grm6 и человеческим геном GRM6 (заштрихована горизонтальными линиями), а также синтетическая область размером 188 п.о., соответствующая участку 200Eп(Grm6) в мышинной модели согласно Kim (часть, которая заштрихована горизонтальными линиями и затемнена). (B) Промоторная последовательность человеческого гена GRM6, включая сайт начала транскрипции (TSS) и сайт начала трансляции (TLSS), последний определен авторами настоящего изобретения как положение 0. Два выбранных промотора также указаны, и консервативная область размером 167 п.о. между мышинным и человеческим генами показана в виде части, заштрихованной горизонтальными линиями. Графики были загружены из геномного браузера UCSC по адресу <https://genome.ucsc.edu/> и изменены. Отрезки, показанные серым цветом, иллюстрируют потенциально важные цис-регуляторные области, включая сайты связывания факторов транскрипции, межвидовые консервативные области (области, консервативные у позвоночных)

и кластеры с гиперчувствительностью к ДНКазе (кластеры с сайтами распознавания ДНКазы). Кроме того, также рассматривались сигнальный пик метки H3K27Ac и пики ChIP-seq.

Фиг. 2. Интенсивность экспрессии mCitrine, управляемой промотором, в ОВС из посмертных эксплантатов сетчатки человека. Эксплантаты сетчатки человека трансдуцировали с помощью scAAV2(7m8)-407En_566P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3), scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3), scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 5), scAAV2(7m8)-407En_454P(hGRM6)-mCitrine (n равняется 3) и scAAV(7m8)-200En-mGluR500P-mCitrine (n равняется 4). mCitrine был иммуногистохимически помечен, и интенсивность флуоресценции в экспрессирующих ON-биполярных клетках определяли как меру интенсивности экспрессии трансгена. Промоторный элемент 566P опосредовал гораздо более слабую экспрессию mCitrine в ОВС по сравнению с комбинациями промоторов с проксимальным элементом 454P. Поэтому для всех последующих экспериментов был выбран 454P_770En_454P(hGRM6) (F равняется $5,42 \pm 0,9$; среднее значение \pm s.d.) и 444En_454P(hGRM6) (F равняется $5,59 \pm 0,51$; среднее значение \pm s.d.) проявляли одинаковую эффективность в отношении интенсивности экспрессии трансгена и значительно более высокую эффективность, чем 200En-mGluR500P, полученный из мышинового генома (F равняется $3,94 \pm 0,45$; среднее значение \pm s.d.). * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, *** означает, что P равняется 0,001 или меньше, и n.s. означает незначимые различия (однофакторный ANOVA с критерием значимости Тьюки).

Фиг. 3. Специфичность промотора в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки (сОВС), в эксплантатах сетчатки человека. Эксплантаты сетчатки человека трансдуцировали с помощью scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine, scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine, scAAV2(7m8)-407En_454P(hGRM6)-mCitrine или scAAV(7m8)-200En-mGluR500P-mCitrine. Вертикальные криосрезы метили антителом к mCitrine, PKC α (для биполярных клеток, представляющих собой палочки (RBC) и антителом к Ga0 (повсеместно встречающемуся маркеру ОВС) и осуществляли подсчет клеток, экспрессирующих mCitrine. (А) Исходя из подсчета клеток, 770En_454P(hGRM6) вызывал экспрессию в значительно большем количестве сОВС, чем 200En-mGluR500P. (В) Нормализация количества целевых сОВС и RBC к их общему количеству в пределах определенных областей сетчатки, в которых были проведены подсчеты, демонстрирует, что 770En_454P(hGRM6) и 407En_454P(hGRM6) намного более эффективно управляют экспрессией в сОВС, чем 200En-mGluR500P, который характеризуется явной предпочтительностью в отношении RBC. 770En_454P(hGRM6) даже демонстрирует одинаковую предпочтительность в отношении сОВС и RBC, составляющую 50% для каждого из них, что является важным отличительным признаком фовеального средства генной терапии, где существуют только сОВС. (С) Предпочтительность промотора 444En_454P(hGRM6) в отношении типа сОВС (n равняется 5) существенно не отличалась от предпочтительности промотора 770En_454P(hGRM6). Показаны средние значения \pm s.d., * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше (однофакторный ANOVA с критерием значимости Тьюки). Указаны только значимые различия.

Фиг. 4. Эффективность и специфичность экспрессии mCitrine в ОВС, управляемой с помощью 770En_454P(hGRM6), в эксплантатах сетчатки человека (А) Сравнение экспрессии mCitrine, управляемой с помощью 770En_454P(hGRM6), с экспрессией mCitrine, управляемой с помощью 200En-mGluR500P, при упаковке в scAAV2(7m8). 770En_454P(hGRM6) демонстрирует гораздо более высокую предпочтительность в отношении ОВС по сравнению с 200En-mGluR500P, и последний, кроме того, характеризуется значительно более высокой нецелевой экспрессией в амакриновых клетках. Показаны % экспрессирующих клеток определенного типа клеток в виде средних значений \pm s.d., ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и *** означает, что P равняется 0,001 или меньше (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 5. Промотор 770En_454P(hGRM6) надежно и широко управляет экспрессией трансгена в дегенерирующей сетчатке мыши rd1. Мышам rd1 путем инъекции вводили 3×10^9 vg AAV, несущего трансген MWOPN_mGluR6_IRES2_TurboFP635 (SEQ ID NO: 16, плазмидная карта (фиг. 9), в возрасте 22 недель. На схемах А-Д серым цветом представлены трансдуцированные участки сетчатки в тотальных препаратах сетчатки. А) ssAAV2(7m8) в комбинации с 200En-mGluR500P также экспрессируется в сетчатке rd1, но только в ограниченных участках (в отличие от 4xGrm6-SV40). В) ssAAV(7m8) в комбинации с 770En_454P(hGRM6) приводит к более обширной и распространенной трансдукции дегенерирующей сетчатки по сравнению с 200En-mGluR500P, вероятно вследствие повышенной интенсивности экспрессии, которая преодолевает порог экспрессии, если имеет место подавление Grm6, вызванное дегенерацией. С) Пример микрофотографии тотального препарата обработанной сетчатки мыши rd1, подвергающейся ОКР-тестированию, полученной посредством лазерной сканирующей микроскопии (см. пример 7 и фиг. 6), где TurboFP635 был помечен иммуногистохимически (изображено на схеме В). (D) Средняя специфичность (% экспрессирующих ОВС от всех экспрессирующих клеток, $66,6 \pm 8,5\%$) и эффективность экспрессии (% экспрессирующих ОВС от всех ОВС, $54,7 \pm 8,3$) в дегенерирующей сетчатке rd1. Среднее значение \pm s.d., N равняется 9 (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 6. Восстановление зрения, определенное по оптомоторному рефлексу, у мышей rd1 с полным отсутствием фоторецепторов, которые были интравитреально и билатерально обработаны с помощью

ssAAV(7m8)-MWOPN_mGluR6_IRES2_TurboFP635 в возрасте 22 недель. Остроту зрения измеряли через 41, 47, 55, 82 и 112 дней после трансдукции посредством определения порога пространственных частот, при котором оптокинетический ответ все еще вызывался в виртуальной оптомоторной системе. Обработанные мыши (N равняется 3) продемонстрировали значительное повышение остроты зрения по сравнению с контрольными однопометниками rd1, которым не вводили вектор (N равняется 7), но все еще характеризовались значительно более низкой остротой зрения, чем контрольные мыши дикого типа (C57BL/6J, N равняется 10). Показано среднее значение (по всем испытаниям и особям) \pm s.d., ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и *** означает, что P равняется 0,001 или меньше (Т-критерий Стьюдента).

Фиг. 7. Высокоэффективная экспрессия mCitrine в сОВС эксплантированной макулы человека под контролем промотора 770En_454P(hGRM6). Пример эксплантата макулы человека, трансдуцированного с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine и иммуногистохимически помеченного антителом к трансгену mCitrine, а также антителом к ОВС (α o) и красителем, окрашивающим ядра клеток (DAPI). (A) представляет собой схему макулы человека и участков, где были сделаны микрофотографии, изображенные на фигурах B и C. Фовеола содержит только фоторецепторы М- и L-колбочек и не содержит ни ОВС, ни RGC, поскольку их клеточные тела вытеснены в сторону, чтобы свет мог проходить без дифракции к фоторецепторам. Фовеа содержит только колбочки (M, L и S) и является участком наибольшей остроты зрения с системой карликовых клеток, где каждая колбочка соединяется с одной ВРС и одной RGC. На фигуре (B) показан срез через парафовеа с DAPI (верхняя микрофотография), демонстрирующий четкое наложение фоторецепторов (ONL), ВРС и амакриновых клеток (INL), а также 3-мерное наложение RGC (GCL), указывающее на макулу. На нижней микрофотографии показано только мечение с применением трансгена, указывающее на экспрессию mCitrine исключительно в INL, где расположены ОВС. На фигуре (C) показан срез через фовеа. На микрофотографии слева показано только мечение α o в клетках ОВС, все из которых не помечены антителом к РКС (не показано) и поэтому четко идентифицируются как сОВС. На правой микрофотографии дополнительно изображено мечение с помощью mCitrine в цитоплазме, что указывает на то, что практически каждая сОВС из фовеа экспрессирует mCitrine (показано стрелками). Это очень четкое доказательство того, что 770En_454P(hGRM6) обеспечивает превосходную экспрессию в сОВС, в частности в сОВС макулы человека, и, следовательно, хорошо подходит для восстановления остроты зрения у пациентов-людей.

Фиг. 8. Плазмидная карта плазмиды AAV, кодирующей опсин колбочек и химерный оптогенетический белок mGluR6, MWOPN_mGluR6-IRES2-TurboFP635, под контролем нового промотора 770En_454P(hGRM6). TurboFP635 представляет собой маркер, представляющий собой красный флуоресцентный белок, для идентификации экспрессии, WPRE и BGH μ A представляют собой регуляторные последовательности, и 5'- и 3'-ITR (внутренние повторы) представляют собой области, используемые AAV для упаковки трансгена (между ITR) в капсид. Данную плазмиду использовали для трансдукции дегенерирующих сетчаток мышей rd1 (фигуры и примеры 5 и 6). Также приведены праймеры для слияния для клонирования.

Фиг. 9 Пример специфичности экспрессии в ОВС и эффективности 770En_454P(hGRM6) и 444En_454P(hGRM6), управляющих экспрессией mCitrine в эксплантатах сетчатки человека. Вертикальные криосрезы через эксплантаты сетчатки человека, трансдуцированные с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine (A) и scAAV2(7m8)-444En_454P(hGRM6)-mCitrine (B) соответственно. Криосрезы были помечены ядерным красителем DAPI (серый цвет, показан только в дальнем левом углу микрофотографий для ориентации) и маркером, представляющим собой трансген mCitrine (белый цвет). 770En_454P(hGRM6) характеризуется эффективностью в отношении ОВС (процент светлых клеток в INL), составляющей $85,2\% \pm 12,3\%$ (n равняется 4), и 444En_454P(hGRM6) характеризуется эффективностью, составляющей $87,9\% \pm 6,5\%$ (n равняется 5). ONL: наружный ядерный слой, INL: внутренний ядерный слой, GCL: слой ганглиозных клеток. Биполярные клетки расположены на периферии INL.

Примеры

Пример 1. Анализ изменений экспрессии гена Grm6 в мышинной модели rd1.

Авторы настоящего изобретения выбрали ген (Grm6 у мыши и GRM6 у человека), кодирующий метаболитный глутаматный рецептор 6 (mGluR6), селективно экспрессируемый в ON-биполярных клетках (ОВС) сетчатки, в качестве матрицы для конструирования промотора. Это произошло потому, что экспрессия mGluR6 является селективной в отношении ОВС, что недавно было подтверждено посредством транскриптомных анализов одной клетки сетчатки взрослой мыши (Siegert et al. Nat Neurosci 2012. 15: p. 487-95), и также явно проявляется в линии трансгенных мышей, ранее созданной авторами настоящего изобретения, где полноразмерный промотор гена Grm6 управляет экспрессией трансгена, в частности в ОВС сетчатки (van Wyk et al., PloS Biol 2015. 13: p. e1002143). Кроме того, были успешно сконструированы короткие варианты промотора, полученные из мышинового гена Grm6, и было показано, что они обеспечивают предпочтительную экспрессию в ОВС (Cronin et al., EMBO Mol Med, 2014. 6(9): p. 1175-1190; Kim et al. J Neurosci 2008. 28: p. 7748-7764; Lagali et al. Nat Neurosci 2008. 11 p: 667-675). Kim et al. первоначально выбрали дистальную энхансерную последовательность размером 200 п.о. в промоторе

мышинного гена *Gtm6*, которая усиливала ОВС-специфическую экспрессию в сетчатке мышей дикого типа. Эта энхансерная последовательность впоследствии использовалась в промоторе 4xGRM6-SV40 [Cronin, T., et al., *EMBO Mol Med*, 2014. 6(9): p. 1175-1190], который содержит четыре эти энхансерные последовательности размером 200 п.о. в tandem. Однако недавно авторы настоящего изобретения показали, что промотор 4xGRM6-SV40 [Cronin, T., et al., *EMBO Mol Med*, 2014. 6(9): p. 1175-1190] был полностью подавлен в дегенерирующей сетчатке мыши rd1 (C3H/HeOu), даже когда генная терапия проводилась в возрасте 3,5 недель до полной дегенерации фоторецепторов (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. 11: p. 161). Это делает 4xGRM6-SV40 (и в равной степени GRM6-SV40) непригодным для лечения дегенерирующей сетчатки. Кроме того, базальный вирусный промотор SV40 сталкивается с такими проблемами, как сайленсинг при постоянной активации и сверхэкспрессия белка, приводящая к клеточной цитотоксичности. Чтобы сконструировать более подходящие ОВС-специфические промоторы, авторы настоящего изобретения сначала исследовали, остается ли экспрессия *Gtm6* повышенной в ходе процесса дегенерации в мышинной модели дегенерации rd1. Авторы настоящего изобретения использовали мышиную модель rd1 на том основании, что промоторы, активные в данной модели тяжелой и быстрой дегенерации, вероятно, будут активны при большинстве менее тяжелых дегенеративных заболеваний сетчатки. Ранее это было продемонстрировано авторами настоящего изобретения, сравнивающими экспрессию трансгена в мышинной модели rd10 с более медленной дегенерацией (B6.CXB1-Pde6brd10), где 4xGRM6-SV40 все еще был способен управлять некоторой экспрессией [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. 11(161): p. 161.]. Авторы настоящего изобретения проводили количественную оценку экспрессии гена *Gtm6* в сетчатках мышей rd1 посредством количественной ПЦР в режиме реального времени во временных точках P14, P21, P28 и P54 и сравнивали уровни экспрессии с уровнями экспрессии в сетчатках мышей C57BL/6J дикого типа. Для нормализации уровней экспрессии использовали экспрессию рибосомного белка L8 (*Rpl8*). Экспрессия *Gtm6* оставалась постоянной в ходе дегенерации (P равняется 0,8795), за исключением небольшого подавления (в 0,59 раза) между P21 и P28. Из этого авторы настоящего изобретения сделали вывод, что серьезное подавление, наблюдаемое в случае промотора 4xGRM6-SV40 [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. 11(161): p. 161.], вероятно не было связано с подавлением энхансерных элементов *Gtm6*, а вероятно было следствием пониженной функциональности базального промотора SV40 с прогрессирующей дегенерацией. Следовательно, ген *Gtm6* был использован авторами настоящего изобретения в качестве матрицы для конструирования ОВС-специфического промотора.

Пример 2. Конструирование промоторов на основе GRM6.

Для согласования с механизмом транскрипции человека в свете будущего применения в терапии человека авторы настоящего изобретения использовали в качестве матрицы последовательность человеческого гена GRM6, а не последовательность мышинного гена *Gtm6*.

Авторы настоящего изобретения использовали Основной инструмент для поиска локального выравнивания (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), оптимизированный для "частично сходных" последовательностей (blastn) [Altschul et al., *J Mol Biol*, 1990. 215(3): p. 403-10; Coordinators, *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(D1): p. D8-D13], для выравнивания последовательностей мышинного гена *Gtm6* и человеческого гена GRM6. Для определения характеристик энхансера авторы настоящего изобретения выравнивали 1500 п.о. слева и справа от мышинной энхансерной последовательности 200En, идентифицированной Kim et al. [Kim et al., *J Neurosci*, 2008. 28(31): p. 7748-64.]. Авторы настоящего изобретения обнаружили консервативную последовательность длиной 310 п.о. между геномами мыши и человека [от -13819 до -13510 отн. сайта начала трансляции (TLSS) из гена GRM6], выходящую за пределы последовательности 200En, определенной Kim et al. как в 3', так и в 5'-направлении (фиг. 1A, участки, заштрихованные горизонтальными полосами). Чтобы идентифицировать промоторные последовательности, авторы настоящего изобретения сосредоточились на последовательностях гена GRM6, расположенных в 5'-направлении от сайта начала трансляции (TLSS, определен авторами настоящего изобретения как положение 0) (фиг. 1B). После выравнивания авторы настоящего изобретения использовали геномный браузер Института геномики Калифорнийского университета в Санта-Круз (геномный браузер UCSC) [Church et al., *PLoS Biol*, 2011. 9(7): p. e1001091.], [Kent et al., *Genome Res*, 2002. 12(6): p. 996-1006.; Kuhn et al. *Brief Bioinform*, 2013. 14(2): p. 144-61.] [<https://genome.ucsc.edu/>; сборка генома, февраль 2009 г. (GRCh37/hg19)] для идентификации потенциальных регуляторных последовательностей гена GRM6, таких как межвидовые консервативные последовательности, области с активным хроматином (кластеры с гиперчувствительностью к ДНКазе или фрагменты метки H3K27Ac) или сайты связывания факторов транскрипции. Базу данных регуляции транскрипции генов (GTRD) [Yevshin et al., *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(D1): p. D61-D67] дополнительно использовали для идентификации пиков иммунопреципитации хроматина и секвенирования ДНК (ChIP-seq), обеспечивая экспериментальное подтверждение сайтов связывания факторов транскрипции. В совокупности данная информация позволила авторам настоящего изобретения определить последовательности в идентифицированных выше областях с вероятной функциональной важностью в отношении экспрессии гена GRM6.

Затем авторы настоящего изобретения выбрали три возможные энхансерные области [407En(hGRM6), 444En(hGRM6) и 770En(hGRM6)] и две возможные промоторные области [566P(hGRM6) и 454P(hGRM6)] (фиг. 1 и табл. 1) согласно следующему обоснованию: 407En(hGRM6)

(от -13873 до -13467 отн. TLSS из гена GRM6) состоит из консервативной последовательности размером 300 п.о. между мышинным и человеческим геномами (заштрихована горизонтальными линиями на фиг. 1А). 770En(hGRM6) (от -14236 до -13467 отн. TLSS из гена GRM6) в дополнение к 407En(hGRM6) также содержит 3'-пики ChIP-seq и кластер с гиперчувствительностью к ДНКазе (от -13990 до -13816 отн. TLSS из гена GRM6). 444En(hGRM6) (от -14033 до -13590 отн. TLSS из гена GRM6) представляет собой усеченный на 3'- и 5'-концах вариант 770En(hGRM6), содержащий только 3' и 5' пики ChIP-seq.

При выравнивании последовательностей от -1000 до -1 (отн. TLSS) из гена GRM6 авторы настоящего изобретения идентифицировали консервативную область размером 167 п.о. (от -425 до -259 отн. TLSS из гена GRM6) (фиг. 1В, заштрихована горизонтальными линиями на фиг. 1В). Включив эту консервативную последовательность авторы настоящего изобретения сконструировали два промотора: 566P(hGRM6) (от -691 до -126 отн. TLSS из гена GRM6), дополнительно содержащий 5'-сайт начала транскрипции (TSS, -179 отн. TLSS из гена GRM6) и сигнальный 5'-пик метки H3K27Ac (от -656 до -405 отн. TLSS из гена GRM6), а также второй 3'-пик ChIP-Seq ERG. ERG известен как активатор, который взаимодействует с FLI1, содержащейся в 770En и 444En. Вторая выбранная промоторная последовательность 454P(hGRM6) (от -453 до +1 отн. TLSS из гена GRM6) простирается дальше 5'-конца по сравнению с 566P(hGRM6), включая TLSS и дополнительные потенциально регуляторные последовательности, расположенные между TLSS и TSS, такие как пики ChIP-Seq TCF7L1 и MYC.

Пять возможных комбинаций энхансерных и промоторных последовательностей (табл. 1), предшествующих репортерному трансгену, клонировали между последовательностями ITR вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), как подробно описано в приведенных ниже примерах с применением стандартных методов молекулярной биологии:

Таблица 1

Название	Выбранные комбинации энхансер/промотор	
	Длина	№ последовательности
407En_454P(hGRM6)	867 п. о.	11
444En_454P(hGRM6)	917 п. о.	15
407En_566P(hGRM6)	978 п. о.	12
770En_454P(hGRM6)	1243 п. о.	13
770En_566P(hGRM6)	1354 п. о.	14

Пример 3. Оценка функционального промотора в сетчатке человека.

Имея промотор, сконструированный для гена GRM6 человека в свете терапевтического применения у пациентов-людей, все промоторы оценивали в посмертных эксплантатах сетчатки человека. Для этого промоторы объединяли с трансгеном mCitrine и упаковывали в самокомплементарные (sc) капсиды AAV, в частности scAAV2(7m8) (Dalkara et al. *Sci Transl Med* 2013. 5: p. 189ra76).

Примерно 5×10^6 vg (векторных геномов) добавляли к стороне RGC культивируемых посмертных эксплантатов сетчатки человека в день 1, как подробно описано в [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. 11(161): p. 161.]. Сетчатки замораживали на 7-й день культивирования, когда была визуально заметна экспрессия трансгена из scAAV. Авторы настоящего изобретения окрашивали криосрезы в отношении репортерного белка mCitrine и маркера ОВС Gо α , чтобы визуализировать локализацию экспрессии и сравнить значения интенсивности экспрессии. До 85% ОВС экспрессировали mCitrine в хорошо трансдуцированных участках (фиг. 9). Чтобы сравнить производительность с современным уровнем техники, промотор Lu 200En-mGluR500P (Lu et al. *Gene Ther*, 2016. 23: p. 680-9.) был также упакован в scAAV2 (7m8) и использован для трансдукции эксплантата сетчатки человека. Для каждого промотора культуры из трех глаз человека трансдуцировали конструкциями промоторов и криосрезы по всей сетчатке гистологически окрашивали и анализировали. Для контроля различий между экспериментами обработку и иммуногистохимический анализ проводили для всех образцов параллельно. Флуоресцентные изображения получали с помощью ZEISS LSM 880 с программным обеспечением Airyscan и ZEN 2.1. Микрофотографии, полученные посредством конфокальной микроскопии (z-стеки), были сделаны под 20x объективом с идентичными настройками микроскопа. Для определения средней эффективности трансдукции определяли цитоплазматическую флуоресценцию Alexa488 (вторичное антитело к mCitrine) в трансдуцированных клеточных телах ОВС [mCitrine(+) и Gо α (+)]. В частности, произвольные значения флуоресценции в соматическом участке ОВС диаметром 4,15 мкм определяли с применением функции яркость программного обеспечения Fiji для обработки изображений. Анализы изображений, включая количественную оценку флуоресценции и подсчет клеток, выполняли с помощью Fiji ulfils. (версия 2.0.0, <https://fiji.sc/>, Schindelin et al., *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 676-82). Для нормализации значение флуоресценции каждой экспрессирующей ОВС [mCitrine(+) и Gо α (+)] делили на среднее значение фоновой флуоресценции, определенное посредством измерений в неэкспрессирующих ОВС [mCitrine(-) и Gо α (+)]. Как видно из фиг. 2, базальный промотор 566P опосредовал самую слабую экспрессию mCitrine в ОВС, тогда как экспрессия под контролем 454P всегда была значительно интенсивнее, чем экспрессия под контролем промотора Lu 200En-mGluR500P, независимо от используемого энхансерного элемента. Поэтому

для всех последующих экспериментов был выбран 454P_770En_454P(hGRM6) (F равняется $6,03 \pm 1,53$; среднее значение \pm s.d.) и 407En_454P(hGRM6) (F равняется $5,65 \pm 0,09$; среднее значение \pm s.d.) проявляли одинаковую эффективность и были значительно лучше, чем 200En-mGluR500P, полученный из мыши Lu (F равняется $4,49 \pm 0,22$; среднее значение \pm s.d.), и поэтому оба были проанализированы более подробно.

Пример 4. Значительно повышенная предпочтительность в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки, в эксплантатах сетчатки человека

На следующей стадии срезы анализировали в отношении специфичности экспрессии типа клеток ОВС. С этой целью срезы окрашивали с помощью антител к трансгену mCitrine, антител к повсеместно встречающимся маркерам ОВС Gα α и специфического антитела к РКСа в биополярных клетках, представляющих собой палочки. Клетки [mCitrine(+), РКСа(+), Gα α (+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие ON-биополярные клетки, представляющие собой палочки (RBC), тогда как клетки [mCitrine(+), РКСа(-), Gα α (+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие ON-биополярные клетки, представляющие собой колбочки (сОВС). Соответственно, клетки [mCitrine(-), РКСа(+)] были идентифицированы как неэкспрессирующие RBC, и клетки [mCitrine(-), РКСа(-), Gα α (+)] были определены как неэкспрессирующие сОВС. Результаты, показанные на фиг. 3, ясно указывают, что как 770En_454P(hGRM6), так и 407En_454P(hGRM6) опосредуют значительно более высокую экспрессию трансгена в сОВС по сравнению с 200En-mGluR500P. Мету предпочтительности в отношении сОВС (фиг. 3В) определяли посредством нормализации количества экспрессирующих сОВС и RBC к общему количеству сОВС и RBC в анализируемом участке сетчатки. Такая нормализация продемонстрировала, что 770En_454P(hGRM6) (предпочтительность в отношении сОВС составляет 49,5%) и 407En_454P(hGRM6) (предпочтительность в отношении сОВС составляет 36,4%) обладают значительно повышенной способностью к управлению экспрессией в типе клеток сОВС по сравнению с 200En-mGluR500P (предпочтительность в отношении сОВС составляет 16,3%). Следует особо отметить, что 770En_454P(hGRM6) демонстрирует эквивалентную предпочтительность в отношении RBC и сОВС (~50% в каждом случае, фиг. 3В).

Также с помощью scAAV2(7m8)-770En_454P(hGRM6)-mCitrine трансдуцировали макулы эксплантационных сетчаток человека. Иммуноочечение с помощью mCitrine, РКСа и Gα α ясно продемонстрировало, что фовеа содержит только сОВС, и что 770En_454P(hGRM6) управляет экспрессией mCitrine практически во всех сОВС (фиг. 7). Способность эффективно управлять экспрессией трансгена в сОВС фовеа человека имеет большое значение для терапии человека, поскольку фовеа опосредует высокую остроту зрения и таким образом представляет собой первичную мишень для генной терапии сетчатки, восстанавливающей зрение, - фовеа содержит только сОВС.

Пример 5. Специфичность 770En_454P(hGRM6) в отношении ОВС по сравнению с 200En-mGluR500P.

Высокая предпочтительность в отношении ОВС необходима, чтобы избежать нецелевых эффектов, таких как искаженная передача сигнала в сетчатке. Срезы сетчатки человека метили антителами к mCitrine (трансгену), Gα α (общему маркеру ОВС) и ядерным красителем DAPI для различения слоев клеток. Это позволяет идентифицировать тип экспрессирующих клеток: фоторецепторные клетки (PR, mCitrine(+), расположены во внешнем ядерном слое), ОВС [mCitrine(+), Gα α (+)] и расположены во внутреннем ядерном слое], амакриновые клетки [AC, mCitrine(+), Gα α (-) и расположены во внутреннем ядерном слое] и ганглиозные клетки (GC, mCitrine(+), расположены в слое ганглиозных клеток). На фигуре 4А четко показано, что новый промотор 770En_454P(hGRM6) характеризуется значительно повышенной предпочтительностью в отношении ОВС ($88,3 \pm 7,8\%$) по сравнению с 200En-mGluR500P ($70,1 \pm 12,2\%$). Кроме того, нецелевая экспрессия под контролем 200En-mGluR500P в целом была выше, в частности в AC ($16,9 \pm 9,1\%$), по сравнению с новым промотором 770En_454P(hGRM6) ($4,1 \pm 3,2\%$). Последнее имеет особенное значение для оптогенетического восстановления зрения, когда нецелевая экспрессия искажает передачу сигнала в сетчатке.

Пример 6. Оценка промотора в дегенерирующей сетчатке мыши.

Важным для терапии сетчатки является доступность ткани для лечения. Это может быть сложной задачей при дегенеративном процессе с анатомическими, функциональными и транскрипционными изменениями. Авторы настоящего изобретения ранее показали, что мышинный промотор Kim 200En-SV40 больше не функционирует в мышинной модели быстрой дегенерации rd1 (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. 11: p. 161). Таким образом, эффективность 770En_454P(hGRM6) [и для сравнения его мышинного аналога 200En-mGluR500P [Lu et al. *Gene Ther* 2016. 23 p: 680-689] тестировали в мышинной модели дегенерации rd1. Промоторы объединяли с оптогенетическим MWOPN_-mGluR6-IRES2-TurboFP635 (SEQ ID NO: 16, плазмидная карта на фиг. 8) трансгеном и упаковывали в ssAAV2(7m8) (Dalkara et al. *Sci Transl Med* 2013. 5: p. 189ra76). 3×10^9 vg вводили посредством интравитреальной инъекции, как описано в (van Wyk et al. *Front Neurosci* 2017. 11: p. 161; van Wyk et al., *PloS Biol* 2015. 13: p. e1002143), в глаза мышей rd1 в возрасте 22 недель на поздней стадии дегенерации. Через 4 недели после инъекций мышей подвергали эвтаназии и извлекали сетчатки для иммуногистохимического анализа, как описано ранее [van Wyk,

M., et al., *Front Neurosci*, 2017. 11(161): p. 161 ;van Wyk et al., *PloS Biol* 2015. 13: p. e1002143]. Авторы настоящего изобретения помечали срезы антителом к трансгену TurboFP635, антителом к ОВС-специфическому маркеру $G\alpha$ и ядерным красителем DAPI. В отличие от 200En-SV40, 770En_454P(hGRM6), а также 200En-mGluR500P, полученный из гена $G\text{tm}6$ мышей Lu, функционировали в ОВС сетчатки rd1 (фиг. 5). Однако 200En-mGluR500P приводил к экспрессии только в ограниченных областях сетчатки, как в качестве примера показано на фигуре 5A, тогда как 770En_454P(hGRM6) приводил к гораздо более обширной и широко распространенной трансдукции дегенерирующей сетчатки (фиг. 5B), вероятно вследствие его повышенной интенсивности экспрессии, которая преодолевает порог экспрессии, если имеет место некоторое подавление $G\text{tm}6$. Чтобы проанализировать специфичность и эффективность экспрессии трансгена (mCitrine), управляемой промотором 770En_454P(hGRM6) в дегенерирующей сетчатке, авторы настоящего изобретения осуществляли инъекции еще 9 мышам rd1 в еще более поздние временные точки (в возрасте 29-33 недель). Через 4 недели животных подвергали эвтаназии, глаза замораживали и делали срезы. Крисрезы снова метили антителами к mCitrine и $G\alpha$ и анализировали под конфокальным микроскопом. Даже в данном случае, в этих полностью дегенерированных сетчатках ~67% всех клеток, экспрессирующих трансген [mCitrine (+), $G\alpha$ (-)], представляли собой ОВС [mCitrine (+), $G\alpha$ (+)]. Аналогичным образом, ~55% всех ОВС [mCitrine (-), $G\alpha$ (+)] экспрессировали трансген [mCitrine (+), $G\alpha$ (+)] (фиг. 5D). Широко распространенная и специфическая экспрессия терапевтического трансгена в дегенерирующей сетчатке имеет фундаментальное значение для эффективной генной терапии.

Пример 7. Оптогенетическая генная терапия и восстановление зрения у мышей rd1.

Чтобы увидеть, поддерживают ли благоприятные свойства 770En_454P(hGRM6) функциональное оптогенетическое восстановление зрения, нацеленное на ОВС, авторы настоящего изобретения проводили доказательный эксперимент с мышинной моделью дегенерации rd1. Авторы настоящего изобретения путем инъекции билатерально вводили 3×10^9 vg ssAAV(7m8)-770En_454P(hGRM6)-MWOPN_mGluR6-IRES2-TurboFP635-WPRE-BGHpA (плазмидная карта, фиг. 8) трем мышам rd1, полностью лишенным фоторецепторов, в возрасте 22 недель. MWOPN_mGluR6 (SEQ ID NO 16) представляет собой химерный белок, полученный из опсина из мышинных колбочек, чувствительного к средней длине волны (MWOPN), и мышинового mGluR6, который функционирует аналогично Opto-mGluR6, опосредуя активность ОВС, и, исходя из этого, восстановление зрения (van Wyk et al., *PloS Biol* 2015. 13: p. e1002143). Авторы настоящего изобретения измеряли остроту зрения посредством выявления оптомоторных ответов (OMR) (согласно [Prusky et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. 45(12): p. 4611-6.] в разные временные точки (дни 41, 47, 55, 82 и 112) после введения в автоматизированный виртуальный барабан OptoDrum (Striatech®), содержащий небольшую камеру (54×54×30 см) с четырьмя экранами (Full-HD IPS-панели с диагональю 23,8"), окружающими платформу, на которой может быть размещено животное. Яркость экранов доводили до 250 кд/м², а дно и верх камеры закрывали зеркалами. С помощью компактной камеры для технической съемки (IR-чувствительный CMOS-датчик размером 1/3" с глобальным затвором и широкоугольным объективом, F1,6) отслеживали движения головы мышей сверху, при этом на экране на разных пространственных частотах отображался вращающийся паттерн из черных и белых несинусоидальных вертикальных полос. С помощью программного обеспечения Optodrum анализировали записанные движения головы и контролировали толщину, контрастность и скорость применяемых стимулов. Скорость движущихся полос была установлена на 12°/с, а контрастность на 100%. Как показано на фигуре 6, медианную остроту зрения каждой мыши определяли на основе всех измеренных значений остроты зрения в различных испытаниях. Медианная острота зрения обработанных мышей составляла $0,29 \pm 0,03$ циклов/° (n равняется 3, \pm s.d., P равняется 0,0048), что значительно лучше, чем у контрольных мышей rd1 без инъекций с $0,15 \pm 0,06$ циклов/° (n равняется 7, P равняется 194 или больше), но все же хуже, чем у мыши C57BL/6 для положительного контроля с нормальным зрением, которая характеризовалась средней остротой зрения $0,43 \pm 0,05$ циклов/° (n равняется 10, s.d., P равняется 0,0006). Однако оптогенетическое средство терапии, нацеливающееся на ОВС, привело к заметному улучшению оптомоторного ответа. В совокупности результаты доказывают, что 770En_454P(hGRM6) удовлетворяет всем требованиям для генной терапии человека, нацеливающейся на ОВС, представляя собой короткий (1243 п.о.) промотор на основе человеческого гена, который при дегенерации по-прежнему является высокоэффективным и специфическим в отношении ОВС, включая сОВС.

Материалы и способы.

Анализ биологической активности.

Анализ биологической активности описаны в приведенных выше разделах примеров. Культивирование и трансдукция эксплантатов сетчатки человека с помощью AAV, а также интравитреальная инъекция AAV в глаза мышей и последующая иммуногистохимическая обработка замороженных срезов сетчатки подробно описаны в другом месте [van Wyk, M., et al., *Front Neurosci*, 2017. 11(161): p. 161.].

Определение специфичности в отношении ON-биполярных клеток, представляющих собой колбочки.

С этой целью криосрезы сетчатки три раза обрабатывали антителами к трансгену mCitrine (Invitrogen, A11122, 1:500), антителами к повсеместно встречающемуся маркеру ОВС $G\alpha$ (EMD,

MAВ3073, 1:750) и специфическим в отношении RBC антителом к PKC α (Santa Cruz, sc8393, 1:750). Клетки [mCitrine(+), PKC α (+), G α (+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие RBC, тогда как клетки [mCitrine(+), PKC α (-), G α (+)] были четко идентифицированы как экспрессирующие сОBC. Предпочтительность в отношении типа ОBC, как изображено на фиг. 3А, определяли по соотношениям экспрессирующих сОBC и всех ОBC [mCitrine(+), PKC α (-), G α (+)]/[G α (+)] и предпочтительность в отношении типа RBC определяли по соотношению экспрессирующих RBC и всех ОBC [mCitrine(+), PKC α (+), G α (+)]/[G α (+)]. Чтобы получить меру предпочтительности экспрессии в сОBC, другими словами, вероятность того, что экспрессия в сОBC происходит, авторы настоящего изобретения определяли соотношение количества экспрессирующих сОBC и RBC соответственно и количества сОBC и RBC в данном конкретном анализируемом участке сетчатки. Эта нормализация была возможной, поскольку клетки [mCitrine(-), PKC α (+), G α (+)] можно четко идентифицировать как неэкспрессирующие RBC, а клетки [mCitrine(-), PKC α (-), G α (+)] как неэкспрессирующие сОBC. Таким образом, соотношение [mCitrine(+), PKC α (+), G α 13(+)]/[mCitrine(-), PKC α (+), G α (+)] представляет собой процент трансдуцированных и экспрессирующих RBC, тогда как соотношение [mCitrine(+), PKC α (-), G α (+)]/[mCitrine(-), PKC α (-), G α (+)] представляет собой процент трансдуцированных и экспрессирующих сОBC в соответствующем анализируемом участке сетчатки. Поэтому результирующие проценты, показанные на фиг. 3В, указывают на вероятность того, что сОBC является трансдуцированной.

Программное обеспечение, использованное для молекулярной инженерии.

Авторы настоящего изобретения использовали геномный браузер Института геномики Калифорнийского университета в Санта-Круз (геномный браузер, <https://genome.ucsc.edu/>) [Kent et al., *Genome Res*, 2002. 12(6): p. 996-1006; Kuhn et al., *Brief Bioinform*, 2013. 14(2): p. 144-61] для изучения геномных последовательностей промоторов и аннотаций генома.

Для идентификации факторов транскрипции и сайтов связывания факторов транскрипции, которые, вероятно, участвуют в регуляции экспрессии генов, контролируемой новыми промоторами на основе GRM6, авторы настоящего изобретения использовали данные ChIP-seq из базы данных регуляции транскрипции генов (GTRD, gtrd.biouml.org/) [Yevshin et al., *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(D1): p. D61-D67].

Плазмидные карты создавали с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance (версия 11.5.2).

Антитела.

Таблица 3

Антитела, использованные для иммуногистохимического анализа						
Первичные антитела	1_1	Антитело к GFP	Кролик	Invitrogen	A-11122	1:500
	1_2	Антитело к GFP	Курица	Abcam	ab13970	1:500
	1_3	Антитело к tRFP	Кролик	Evrogen	AB234	1:500
	1_4	Антитело к PKC α	Мышь	Santa Cruz Biotechnology	sc-8393	1:750
	1_5	Антитело к G α	Мышь	EMD Millipore	MAВ3073	1:750
	1_6	Антитело к G γ 13	Кролик	Santa Cruz Biotechnology	sc-368324	1:500
Вторичные антитела	2_1	Антитело к кроличьему антителу, конъюгированно с Alexa Fluor 488	Коза	Invitrogen	A-11008	1:400
	2_2	Антитело к	Коза	Invitrogen	A-10521	1:400

	мышинному				
	антителу,				
	конъюгированно				
	е с цианином 3				
	Антитело к				
	кроличьему				
2_3	антителу,	Осел	Invitrogen	A-21206	1:400
	конъюгированно				
	е с Alexa Fluor				
	488				
	Антитело к				
	куриному		Jackson	703-175-	
2_4	антителу,	Осел	Imm.Research	155	1:400
	конъюгированно		Laboratories		
	е с цианином 5				

Аппаратное и программное обеспечение для визуализации посредством конфокальной микроскопии.

ZEISS LSM 880 с детектором Airyscan и программным обеспечением ZEN 2.1 использовали для получения изображений посредством конфокальной микроскопии с 20x или 40x объективом. Изображения обрабатывали и оценивали в Fiji [Schindelin et al., Nat Methods, 2012. 9(7): p. 676-82.]. Плагин счетчика клеток использовали для подсчета клеток и стандартные инструменты Fiji использовали для обработки изображений. Плагин Stitch [Preibisch et al., Bioinformatics, 2009. 25(11): p. 1463-5.] использовали в случаях, когда Fiji не удавалось автоматически объединить расположенные рядом изображения, полученные посредством сканирования.

Статистические анализы.

Если не указано иное, значения сравнивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента и приводили средние значения \pm стандартное отклонение для биологических образцов на протяжении всей данной работы. Уровни значимости обозначены звездочками: * означает, что P равняется 0,05 или меньше, ** означает, что P равняется 0,01 или меньше, и *** означает, что P равняется 0,001 или меньше.

Другие способы.

Остальные способы, не описанные выше и в примерах 1 и 2, можно найти в [van Wyk, M., et al., Front Neurosci, 2017. 11(161): p. 161.].

Последовательности.

Таблица 4

Последовательности, использованные в данном исследовании

Название	SEQ ID	Тип	Происхождение
	NO.		
407En(hGRM6)	1	Нуклеиновая кислота	Человек
770En(hGRM6)	2	Нуклеиновая кислота	Человек
444En(hGRM6)	3	Нуклеиновая кислота	Человек
429En(mGrm6)	4	Нуклеиновая кислота	Мышиная
792En(mGrm6)	5	Нуклеиновая кислота	Мышиная
460En(mGrm6)	6	Нуклеиновая кислота	Мышиная
454P(hGRM6)	7	Нуклеиновая кислота	Человек
566P(hGRM6)	8	Нуклеиновая кислота	Человек
454P(mGrm6)	9	Нуклеиновая кислота	Мышиная
566P(mGrm6)	10	Нуклеиновая кислота	Мышиная
407En_454P(hGRM6)	11	Нуклеиновая кислота	Человек
407En_566P(hGRM6)	12	Нуклеиновая кислота	Человек
770En_454P(hGRM6)	13	Нуклеиновая кислота	Человек
770En_566P(hGRM6)	14	Нуклеиновая кислота	Человек
444En_454P(hGRM6)	15	Нуклеиновая кислота	Человек
MWOPN_mGluR6	16	Нуклеиновая кислота	Мышиная
IRES2	17	Нуклеиновая кислота	Пикорнавирус
mCitrine	18	Нуклеиновая кислота	Acquorea victoria
TurboFP635	19	Нуклеиновая кислота	Entacmaea quadricolor
WPRE	20	Нуклеиновая кислота	Вирус гепатита В сурков
pA BGH	21	Нуклеиновая кислота	Крупный рогатый скот
pA sNRP-1	22	Нуклеиновая кислота	Человек
Капсид AAV2 WT	23	Аминокислота	Вирус
Последовательность KOZAK a)	24	Нуклеиновая кислота	Эукариоты
Последовательность KOZAK b)	25	Нуклеиновая кислота	Эукариоты

SEQ ID NO. 1: 407En(hGRM6)

1 ctctgatit aaaggaagta gatactcaaa ataattcatc atggagtgca 50
 51 atatitctg taggcttita gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 100
 101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atggtatcaa 150
 151 atgcttttc tgcacccatt tagataatca tgttttctct ttaatctgtt 200
 201 aatgcgggga attacattaa tagatttctt aagtcattaa tctgctaaag 250
 251 tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tgtattcag 300
 301 ttgcaaata ttggactagg atttttgat ctatattcct tagtttgacc 350
 351 tgtaaatttt atttctgta ctaagtatta gcctcagcaa aggcattgac 400
 401 aaatgtt 407

SEQ ID NO. 2: 770En(hGRM6)

1 gggctcctca cttgccaact gtagatcttg gaaccttca tectcataa 50
 51 ctgcataagc caattccttc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
 101 taataaatat gtacttacat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
 151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcct tatctatcta 200
 201 tttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgttttat 300
 301 gtcctttttt ctgcaactga ctagtgtccc ctagaggga tgataattgg 350
 351 aattattgct ttgctctgat tttaaaggaa gtagatactt caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttatagata acttcatcag 450
 451 tttaaagaag atccttagat tatgaacat ttacaattat gaatgaatat 500
 501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atttagataa tcatgttttt 550
 551 cctttaatct gtaatgctgg tgaattacat taatagattt cctaagtcac 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagacttgg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggatitgt tatctatatt 700
 701 ccttagtttg acctgtaaat ttatttctt gtactaagta ttacccctac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt 770

SEQ ID NO. 3: **444En(hGRM6)**

1 atctattctc tgtgtctttg gagaaccctg acatagtaag caatcatac 50
 51 acctgcaaat gatgaaagct gtgtatttc caaatcagtc gttttatgct 100
 101 ttttttctt gcactgacta gtgccccta gagggaaatga taattggaat 150
 151 tattgtctg ctctgattt aaaggaagta gatactcaa ataattcac 200
 201 atggagtgca atatttctg taggcttta gtagataact tcatcagttt 250
 251 aaagaagatc cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag 300
 301 atgttatcaa atgcttttc tgcattcaat tagataatca tgttttctc 350
 351 ttaatctgtt aatccgggga attacattaa tagatttctc aagtcattaa 400
 401 tctgctaaag tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgac 444

 SEQ ID NO. 4: **429En(mGrm6)**, мышиная последовательность, соответствующая
 407En(hGRM6)

1 aaaacatacc acttagttt aaggactata gtgattccac actagtaag 50
 51 gtgctttctg taggcttta gtaaatagt ttgtcaagct aaagaagatc 100
 101 tccagatggc taaacttta aatcatgaat gaagtagata ttaccaaat 150
 151 gcttttcag catccattta gataatcatg tttttgcct ttaatctgtt 200
 201 aatgtagtga attacagaaa tacatttctc aatcattac atccccaaa 250
 251 tcgtaatat gctaaagtac atctctggct caaacaagac tggttgtgac 300
 301 aggtttgtct ctgtcagttt gtgactgtg ggctggctct tctaccctc 350
 351 ctgcttctg gtttggcctg aacattaatt ttatttatt ttttaattt 400
 401 tacctacaat caattcaca atgtgtgtt 429

 SEQ ID NO. 5: **792En(mGrm6)**, мышиная последовательность, соответствующая
 770En(hGRM6)

1 ggtctcaaca agatacaaat tatgttctct aggtagcaat taacacaagg 50
 51 aacgccttga ggtatgggag gggtgaggaa gctcacaaga tagaccctgg 100
 101 tgcctggaag gaagacagcc aactaaaggt catatcacag tgtcccggga 150
 151 accaacttga agggcttctg ctgtacaaat gtgggagaat ttcatcgtca 200
 201 gaaggctctg caaaggctg aaagtcaccg aactctgtaa gattctatcc 250
 251 tgccttatt cctgtcaaaa tataccagaa ggaatggaac taccctctcc 300
 301 aaaaaataaa taaacaaca aaccacaaa ccacgcacag acaagcatt 350

045729

351 caatacacat gctaaaacat accactttag ttaaggact atagtgattc 400
401 cacactaggt aaggtgcttt ctgtaggctt ttagttaata gttttgtcaa 450
451 gctaaagaag atctccagat ggctaaacit ttaaatcatg aatgaagtag 500
501 atattaccaa atgcttttt cagcatccat ttagataatc atgtttttg 550
551 cctttaatct gttaatgtag tgaattacag aaatacattt cctaaatcat 600
601 tacatcccc aaatcgttaa tctgctaaag tacatctctg gctcaaaaa 650
651 gactgggtgt gacaggtttg tctctgtcag tttgtgactg ttgggctggc 700
701 tctctacc cctctgcttc ttggtttggc ctgaacatta atttatttt 750
751 attttttaa ttttacctac aatcaatttc acaatgtgtg tt 792

SEQ ID NO. 6: **460En(mGrm6)**, мышиная последовательность, соответствующая 444En(hGRM6)

1 ggctctgcaa aggtctgaaa gtcaccgaac tctgtaagat tctatctgc 50
51 ttctattcct gtcaaaatat accagaagga atggaactac cccctccaaa 100
101 aaataataa acaaacaaa caccaaaacca cgcacagaca aagcattcaa 150
151 tacacatgct aaaacatacc actttagttt aaggactata gtgattccac 200
201 actaggtaag gtgctttctg taggctttta gttaatagtt ttgtcaagct 250
251 aaagaagatc tccagatggc taaacttta aatcatgaat gaagtagata 300
301 ttaccaaat gctttttcag catccattta gataatcatg tttttgcct 350
351 ttaatctggt aatgtagtga attacagaaa tacatttctt aatcattac 400
401 atccccaaa tctgtaatct gctaaagtac atctctggct caaacaagac 450
451 tggttgtgac 460

SEQ ID NO. 7: **454P(hGRM6)**

1 ggaggggtct ccaccctcgg agcggctctct catccctccc tagaatcctt 50
51 aaatcctctc tcgctcaggg cctcggccgc atctgtcaca gacttgcctt 100
101 gaaccgacag cggctggcgc aggtgactgg cttggggcgg gacctgggtt 150
151 gtgcgctggg gatggacccc gaggaagagg ggccaagctg tcgggaagcg 200
201 gcagggctgg aggggtggag gcagtggctg ggcgggaccc cgggacagc 250
251 ggttcggcgc ttgtaagagc gagacggagg cccgggcagg cggctgagc 300
301 taactcccca gagcccgaagt ggaaggcgcg ccccgagcgc ctttcccca 350

045729

351 ggacccccgt gtcctcccc gcgccccag cccgcctct ccttccccg 400
401 cctcagagc gctcccccc cctctgtct cccgagccc gctagacgag 450
451 ccga 454

SEQ ID NO. 8: **566P(hGRM6)**

1 ccaagaagag gacagaggca gaaagccagg gacagagact gagaaacaga 50
51 gacctagagg cagaagaaga ctgagataga gatggacaga gattgtgtca 100
101 gacacagccc cagagacagc cagacagtct gatlacagcg caaaccaag 150
151 acaagaaac aggaaaacag acccagagat fgggagaggg aggggaagga 200
201 gatgcgggga gagccagcac cgcaccccc cactcagg aggggtctcc 250
251 acctcggag cggctctca tcctccta gaatcctaa atcctctc 300
301 gctcagggcc tcggccgat ctgtcacaga ctgtctga accgacgagc 350
351 gctggcgcag gtgactggct tgggcccggga gcctgggtgt gcgctgggga 400
401 tggacccga ggaagagggg ccaagctgc gggaagcggc agggctggag 450
451 ggggtggagc agtggtcggg cgggacccc ggcgacaggg ttcgcgctt 500
501 gtaagagcga gacggaggcc cgggacggcc ggctgagcta actccccaga 550
551 gccgaagtgg aagcgc 566

SEQ ID NO. 9: **454P(mGrm6)**, мышиная последовательность, соответствующая 454P(hGRM6)

1 agagagaaga gagcccttc tccacttca agctctggag ggggtctctg 50
51 cctcaccct catcctccc cagaatcctt aaatctcta gactgtagct 100
101 ctgatttac agctgtcaca gactctct actagccaga ggttggctca 150
151 ggtaagcacc actggggagg tagcctaggg tgcgctgggg tgggtccaga 200
201 ggaagagctg cccagaactg tgggggaagg agcgggaccg accatcaaca 250
251 gggggacttt tcaggagaa tgagagcaat cctctggagg cctgggagag 300
301 gctctgagt tgctggtcg cgagtcacca acttttctg cgtctcgt 350
351 gtccggccag aatcccgaag tggcagctga gcacggggtg gcagcttct 400
401 ccggcgctc tcaagcgtc ccgtaact ctttccgc agtcaggag 450
451 caga 454

SEQ ID NO. 10: **566P(mGrM6)**, мышинная последовательность, соответствующая 566P(hGRM6)

1 gaccgaccag gggagtcctt ggactcttt gttcctcttc tgggggtggc 50
 51 gggactgatt gtgtaaatct ctatctcca actttcactc ttatctgtct 100
 101 ctttaatcgg cataatgagg atgagtggcc aagcttattg gtgttgctgg 150
 151 gtcagacaat ttaaaggcag tctaggggag aagcagacc agggagttag 200
 201 agaggcagag agagaagaga gcccttctc cactctcaag ctctggaggg 250
 251 ggtctctgcc ctcaccctca tcctcccca gaatcctaa atcctctaga 300
 301 ctgtagctct gattttacag ctgtcacaga ctgctctac tagccagagg 350
 351 ttgctcagg taagcaccac tggggaggta gcctagggtg cgctgggggtg 400
 401 ggtccagagg aagagctgcc cagaactgtg ggggaaggag cgggaccgac 450
 451 catcaacagg gggactttc agggagaatg agagcaatcc tctggaggcc 500
 501 tgggagaggc tgctgagttg ctggtgcgcg agtcaccaac ttttctcgcg 550
 551 ctctcggtgt ccggcc 566

SEQ ID NO. 11: **407En_454P(hGRM6)**

1 ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc atggagtga 50
 51 atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 150
 101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atgttatcaa 200
 151 atgcttttct tgcatccatt tagataatca tgttttctct ttaatctgtt 250
 201 aatgcgggtga attacattaa tagatttctt aagtcattaa tctgctaaag 300
 251 tgcatctctg ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tgtatttcag 350
 301 tttgcaaata ttggactagg atttttgtat ctatattctt tagtttgacc 400
 351 tgtaaatttt atttctgta ctaagtatta gcctcacgaa aggcattgtc 450
 401 aaatgttctc agcggagggg tctccacctc cggagcggtc tctcatcct 500
 451 ccctagaatc cttaaatcct ctctcgctca gggcctcggc cgcattctgtc 550
 501 acagactgtt cctgaaccga cagcggctgg cgcagggtgac tggcttgggg 600
 551 cgggagcctg ggtgtgcgct ggggatggac cccgaggaag aggggccaag 650
 601 ctgtcgggaa gcggcagggc tggagggtg gaggcagtgg tggggcggga 700
 651 ccccgggcga cagggtcgg cgcttgaag agcagacgg agggccgggc 750
 701 aggccggctg agctaactcc ccagagccga agtggaggc gcgccccgag 800

045729

751 cgccttctcc ccaggacccc ggtgtccctc cccgcgcccc gagccccgcg 850
801 tctccttccc ccgcccctcag agcgctcccc gccctctgt cteccccgag 900
851 cccgctagac gagccga 867

SEQ ID NO. 12: 407En_566P(hGRM6)

1 ctctgatttt aaaggaagta gatacttcaa ataattcadc atggagtgc 50
51 atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt aaagaagatc 100
101 cttagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag atgittatcaa 150
151 atgcttttct tgcattccatt tagataatca tgttttctct ttaactgtt 200
201 aatgcgggtga attacattaa tagatttctc aagtcattaa tctgctaaag 250
251 tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgacattgta tctatttcag 300
301 ttgcaaata ttggactagg atttttgtat ctatattcct tagtttgacc 350
351 tgtaaatttt atttctgta ctaagtatta gcctcacgaa aggcattgtc 400
401 aaatgttct agccaagaag aggacagagg cagaaagcca gggacagaga 450
451 ctgagaaca gagacctaga ggcagaagaa gactgagata gagatggaca 500
501 gagattgtgt cagacacagc cccagagaca gccagacagt ctgagtca 550
551 cgcaaaccaa agacaagaaa acaggaaaac agaccagag attgggagag 600
601 ggaggggaag gagatcgagg gagagccagc accgccacc cccactca 650
651 ggaggggtct ccaccctcgg agcggctctc catcctccc tagaatcct 700
701 aaatcctctc tcgctcaggg cctcggccgc atctgtcaca gacttctct 750
751 gaaccgacag cggctggcgc aggtgactgg ctggggcgg gagcctgggt 800
801 gtgcgctggg gatggacccc gaggaagagg ggccaagctg tgggaagcg 850
851 gcagggtctgg aggggtggag gcagtggctg ggcgggaccc cgggacag 900
901 ggttcggcgc ttgtaagagc gagacggagg cccgggcagg cggctgagc 950
951 taactccca gagccgaagt ggaaggcg 978

SEQ ID NO. 13: 770En_454P(hGRM6)

1 gggctccaa ctgccaact gtagatcttg gaaccttca tcttcataa 50
51 ctgcataagc caattcctc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
101 taataaatat gtacttcat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcadc tatctatcta 200

201 ttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgtttat 300
 301 gtctttttt ctgcactga ctagtcccc ctgagggaa tgataattgg 350
 351 aattattgct ttgctctgat ttaaaggaa gtagatact caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttagtagata acttcatcag 450
 451 ttaaagaag atccttagat tatgaaacat ttacaattat gaatgaatat 500
 501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atttagataa tcatgtttt 550
 551 cttttaatct gtaatgctgg tgaattacat taatagattt cctaagtcat 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagactgg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggatttttg tatctatatt 700
 701 ccttagtttg acctgtaaat ttatttctt gtactaagta ttacccctac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt caattgatat aatgctagcg gaggggtctc 800
 801 caccctcggg gcggtctctc atcctccct agaatcetta aatcctctct 850
 851 cgctcagggc ctcggccgca tctgtcacag acttctctg aaccgacgc 900
 901 ggctggcgca ggtgactggc ttggggcggg agcctgggtg tgcgctgggg 950
 951 atggaccccc aggaagaggg gccaaactgt cgggaagcgg cagggctgga 1000
 1001 ggggtggagg cagtggtcgg gcgggacccc gggcgacagg gttcggcgct 1050
 1051 tgtaagagcg agacggaggc ccgggcaggc cggctgagct aactccccag 1100
 1101 agccgaagtg gaaggcgcgc cccgagcgc ttctccccag gaccccggtg 1150
 1151 tcctccccg cgccccgagc ccgcgctctc ctccccgc cctcagagcg 1200
 1201 ctccccccc ctctgtctcc ccgagcccc ctgacgagc cga 1243

SEQ ID NO. 14: **770En_566P(hGRM6)**

1 gggctccaa cttgccaact gtagatcttg gaaccttca tcttcataa 50
 51 ctgcataagc caattccttc taataaatct gtataatata tctgtctata 100
 101 taataaatat gtactfacat aactctgtat gttacatcta tctattctat 150
 151 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatcctc tatctatcta 200
 201 ttatctatt ctctgtgtct ttggagaacc ctgacatagt aagcaatcat 250
 251 atcacctgca aatgatgaaa gctgtgtatt ttccaaatca gtcgtttat 300
 301 gtctttttt ctgcactga ctagtcccc ctgagggaa tgataattgg 350
 351 aattattgct ttgctctgat ttaaaggaa gtagatact caaataattc 400
 401 atcatggagt gcaatatttt ctgtaggctt ttagtagata acttcatcag 450
 451 ttaaagaag atccttagat tatgaaacat ttacaattat gaatgaatat 500

501 tagatgttat caaatgcttt ttctgcatcc atftagataa tcatgttttt 550
 551 cctttaatct gttaatgcgg tgaattacat taatagattt cctaagtcac 600
 601 taatctgcta aagtgcattt ctgggacaaa ccagacttgg ttatgacatt 650
 651 gtatgtattt cagtttgcaa atattggact aggatttttg tatctatatt 700
 701 ccttagtttg acctgtaaat tttatttctt gtactaagta ttagcctcac 750
 751 gaaaggcatt gtcaaatgtt caattgatat aatgctagcc aagaagagga 800
 801 cagaggcaga aagccaggga cagagactga gaaacagaga cctagaggca 850
 851 gaagaagact gagatagaga tggacagaga ttgtgtcaga cacagcccca 900
 901 gagacagcca gacagtctga gtcagacgca aaccaaagac aagaaaacag 950
 951 gaaaacagac ccagagattg ggagagggag gggaaggaga tgcggggaga 1000
 1001 gccagcaccg ccaccccca cactcaggag gggctctcac cctcggagcg 1050
 1051 gtctctcacc cctccctaga atccttaaat cctctctcgc tcagggcctc 1100
 1101 ggccgcatct gtcacagact tgtctgaac cgacagcggc tggcgcaggt 1150
 1151 gactggcttg gggcgggagc ctgggtgtgc gctggggatg gaccccagg 1200
 1201 aagaggggcc aagctgtcgg gaagcggcag ggctggaggg gtggaggcag 1250
 1251 tggctgggcg ggaccccggg cgacaggggt cggcgcttgt aagagcgaga 1300
 1301 cggagggccc ggcaggccgg ctgagctaac tcccagagc cgaagtggaa 1350
 1351 ggcg 1354

SEQ ID NO. 15. **444En_454P(hGRM6)**

1 atctattctc tgtgtctttg gagaaccctg acatagtaag caatcatatc 50
 51 acctgcaaat gatgaaagct gtgtatttc caaatcagtc gttttatgtc 100
 101 ttttttctt gcactgacta gtgccccta gagggaatga taattggaat 150
 151 tattgtcttg ctctgatttt aaaggaagta gatactcaa ataattcatc 200
 201 atggagtgca atattttctg taggctttta gtagataact tcatcagttt 250
 251 aaagaagatc cftagattat gaaacattta caattatgaa tgaatattag 300
 301 atgttatcaa atgcttttct tgcattccatt tagataatca tgttttctct 350
 351 ttaatctgtt aatgcgggtga attacattaa tagatttctc aagtcattaa 400
 401 tctgctaaaag tgcatttctg ggacaaacca gacttggtta tgaccaattg 450
 451 atataatgct agcggagggg tctccacctt cggagcggtc tctcatcctt 500
 501 ccctagaatc cttaaatctc ctctcgtca gggcctcggc cgcattctgtc 550
 551 acagacttgt cctgaaccga cagcggctgg cgcaggtgac tggcttgggg 600
 601 cgggagcctg ggtgtgcgct ggggatggac cccgaggaag aggggccaag 650

651 ctgtcgggaa gcggcagggc tggaggggtg gaggcagtgg tcgggcggga 700
 701 ccccggggca caggglcgg cgcltlaag agcgagacgg aggcccgggc 750
 751 aggccgctg agctaactcc ccagagccga agtggaaggc gcgccccgag 800
 801 gcctttccc ccaggacccc ggtgtccctc cccgcgccc gagccccgcg 850
 851 tctcttccc ccgcccctag agcgctccc gccctctgt ctccccgag 900
 901 cccgctagac gagccga 917

SEQ ID NO. 16: MWOPN_mGluR6

1 atggcccaa ggcttacagg tgaacagaca ctggaccact atgaggatag 50
 51 caccatgca agcatctca cctatacaa cagcaacagc accaaaggtc 100
 101 ccttgaagg cccaattat cacattgctc ccaggtgggt gtaccacctc 150
 151 accagcact ggatgattct tgtgtcgtt gcatctgtct tcaactatgg 200
 201 actgtgctg gcagccacca tgagattcaa gaagctgctc catccactga 250
 251 actggattct ggtgaacttg gcagttgctg acctagcaga gaccattatt 300
 301 gccagcacta tcagtgttgt gaaccaaact tatggctact tctttctggg 350
 351 acacctctg tgrtctattg aaggctacat tgtctcattg tgtggaatca 400
 401 caggcctctg gtccttgccc atcatttctc gggagagatg gctgtgtgctc 450
 451 tgaagccct tfgcaatgt gagattgat gctaagctgg ccaactgtggg 500
 501 aatcgtctc tctgggtct gggctgctat atggacggcc ccaccaatct 550
 551 ttggtggag caggactgg ccttatggcc tgaagacatc ctgtggccca 600
 601 gactgttca gcggtacctc gtacccggg gttcagctt atatgatggt 650
 651 cctcatggc acgtctgca tctcccact cagcatcatc gtgtctgct 700
 701 acctcaagt gtggctggcc atccgagcag tggcaaagca acagaaagaa 750
 751 tctgagcca ctcaagaagg cgagaaggag gtagacgca tgggtgtggt 800
 801 gatggtctc gcatactgcc tctgctgggg accctatact ttctttgat 850
 851 gctttgctac tgcccacct ggctatgct tccacctct tgtggcctcc 900
 901 ctaccatct actttgcaa aagtgccact atctacaacc ccattatcta 950
 951 tgtctttatg aaccgcagt ttcgaaactg catctfacat ctctttgaa 1000
 1001 agaaggftga tgatagctct gaactttcca gcacctcaa gacagaagtc 1050
 1051 tcactgtct ctfcagctc acctgcagag cagaactgtc agaagcggaa 1100
 1101 gcgcagcctc aagaagacct ccacgatggc ggccccgccc aagagcgaga 1150
 1151 actcagagga cgccaagaca gagaccagcc aagtggcggc tgccaagagc 1200
 1201 aggatcacca gcgagggcga gtacatcccc ctggaccaga tcgacatcaa 1250

1251 cgtgtaa

1257

SEQ ID NO. 17: **IRES2**

1 gccctctcc ctccccccc ctaacgta ctggccgaag ccgcttggaa 50
 51 taagcccggt gtgcgtttgt ctatatgta tttccacca tattgccgtc 100
 101 ttttgcaat gtgagggccc ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca 150
 151 ttctagggg tctttcccct ctgccaaaag gaatcaagg tctgttgaat 200
 201 gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc 250
 251 tgtagcgacc ctttcaggc agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc 300
 301 tctcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaa ggccggcaca 350
 351 cccagtgcc acgttgtag ttggatagt gtggaagag tcaaatggct 400
 401 ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc 450
 451 attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgt 500
 501 tagtgcaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt 550
 551 tttccttga aaaacacgat gataatatgg ccaca 585

SEQ ID NO. 18: **mCitrine**

1 atggtgagca agggcgagga gctgttacc ggggtggtgc ccatcctggt 50
 51 cgagctggac ggcgacgtaa acggccaca gttcagctg tccggcgagg 100
 101 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc 150
 151 accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca cttcggcta 200
 201 cggcctgatg tgcttcgccc gctaccccca ccacatgaag cagcagcact 250
 251 tctcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatctc 300
 301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg 350
 351 cgacacctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg 400
 401 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactaca cagccacaac 450
 451 gtctatatca tggccgaca gcagaagaac ggcatcaagg tgaactcaa 500
 501 gatccggcac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc 550
 551 agcagaacac cccatcggc gacggccccg tgctgtgcc cgacaaccac 600
 601 tacctgagct accagtcaa gctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga 650
 651 tcacatggtc ctgctggagt tctgaccgc cgccgggate actctcgca 700
 701 tggacgagct gtacaagtcc ggataa 726

SEQ ID NO. 19: **TurboFP635**

1 atggtgggtg aggatagcgt gctgatcacc gagaacatgc acatgaaact 50
 51 gtacatggag ggcaccgtga acgaccacca cttcaagtgc acatccgagg 150
 101 gcgaaggcaa gccctacgag ggcaccaga ccatgaagat caaggtggtc 200
 151 gagggcgcc ctctcccctt cgccttcgac atcctggcta ccagcttcat 250
 201 gtacggcagc aaaacctta tcaaccacac ccagggcacc cccgacttct 300
 251 ttaagcagtc cttccctgag ggcttcacat gggagaggat caccacatac 350
 301 gaagacgggg gcgtgctgac cgctaccag gacaccagcc tccagaacgg 400
 351 ctgcctcacc tacaacgtca agatcaacgg ggtgaacttc ccatccaacg 450
 401 gccctgtgat gcagaagaaa aactcggct gggaggccag caccgagatg 500
 451 ctgtaccccg ctgacagcgg cctgagaggc catagccaga tggccctgaa 550
 501 gctcgtgggc gggggctacc tgcactgctc cctcaagacc acatacagat 600
 551 ccaagaacc cgtaagaac ctcaagatgc cgggcttcta ctctgtggac 650
 601 aggagactgg aaagaatcaa ggaggccgac aaagagacct acgtcgagca 700
 651 gcacgagatg gctgtggcca ggtactgcca cctgcctagc aaactggggc 750
 701 acagctga 708

SEQ ID NO. 20: **WPRE**

1 aatcaacctc tggattaca aatttggaa agattgactg gtattcttaa 50
 51 ctatgttct cctttacgc tatgtggata cgctgctta atgcctttgt 100
 101 atcatgtat tgctcccgt atggcttca tttctcctc ctgtataaa 150
 151 tcctggttc tctcttta ttaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg 200
 201 tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacg aacccccact ggttggggca 250
 251 ttgccaccac ctgtcagctc cttccggga ctttcgctt cccctccct 300
 301 attgccacgg cggaaactcat cgcgcctgc cttgcccgt gctggacagg 350
 351 ggctcggctg ttggcactg acaattccgt ggtgtgtcg gggaaatcat 400
 401 cgtccttcc ttggctctc gcctgtgtg ccacctggat tctgcgagg 450
 451 acgtcctct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttcttc 500
 501 ccgggcctg ctgccgctc tgcggcctct tccgctctt cg 542

SEQ ID NO. 21: pA BGH

1 gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgtt gccctcccc 50
 51 cgtgcctccc ttgacctgg aagggtccac tcccactgtc ctttctaata 100
 101 aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg 150
 151 ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatg 200
 201 caggcatgct gggga 215

SEQ ID NO. 22: pA sNRP-1

1 aaataaata cgaatg 17

SEQ ID NO. 23: Капсид AAV2 WT

MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPY KYLGPFGNLD 60
 KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNFY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120
 AKKRVLLEPLG LVEEVPKTPA GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD 180
 SVPDPQLGQ PPAAPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI 240
 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI 300
 NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG 360
 CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQA VGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVFP 420
 HSSYAHSQSL DRLMNP LIDQ YLYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG 480
 PCYRQQRVSK TSADNNNSEF SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL 540
 IFGKQGSSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV 600
 LPGMVWQDRD VYLQGIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILKN TPVPANPSTT 660
 FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNP EIYQ TSNYNKSVNV DFTVDINGVY 720
 SEPRPIGTRY LTRNL 735

SEQ ID NO 24
 gccgccAccAUGG
 SEQ ID NO 25
 gccgccGccAUGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащая:

- a) элемент энхансерной последовательности, выбранный из SEQ ID NO 1-3, и
- b) элемент промоторной последовательности под SEQ ID NO 7.

2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты длиной от 850 пар оснований (п.о.) до 1500 п.о., содержащая:

- a) элемент энхансерной последовательности, который на по меньшей мере 70% (или больше) идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1-3, и
- b) элемент промоторной последовательности, который на 70% или больше идентичен последовательности под SEQ ID NO 7,

и при этом указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биополярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 40% или больше, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13, и предпочтительностью в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 20% или больше.

3. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где элемент энхансерной последовательности на 75% или больше, на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1-3.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где элемент промоторной последовательности на 75% или больше, более конкретно на 80% или больше, более конкретно на 85% или больше, более конкретно на 90% или больше, более конкретно на 95% или больше, еще более конкретно на 98% или

больше, наиболее конкретно на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO 7.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется специфичностью к ON-биополярным клеткам, представляющим собой колбочки, составляющей 50% или больше, более конкретно 60% или больше, еще более конкретно 70% или больше, более конкретно 80% или больше, еще более конкретно 90% или больше, наиболее конкретно 100%, характерной для последовательности под SEQ ID NO 13.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.2, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты характеризуется предпочтительностью в отношении ON-биополярных клеток, представляющих собой колбочки, составляющей 25% или больше, более конкретно 30% или больше, еще более конкретно 35% или больше, более конкретно 40% или больше, наиболее конкретно 50% или больше.

7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, где выделенная молекула состоит из одного и только одного из указанных элементов энхансерной последовательности, одного и только одного из указанных элементов промоторной последовательности и необязательно спейсера, отделяющего элемент энхансерной последовательности от элемента промоторной последовательности.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 и SEQ ID NO 15, или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 и SEQ ID NO 15, или состоящая из нее.

9. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая последовательность под SEQ ID NO 11 или под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 11 или SEQ ID NO 13, или состоящая из нее, в частности, содержащая последовательность под SEQ ID NO 13 или состоящая из нее, или содержащая последовательность, характеризующуюся 98% или большей идентичностью с SEQ ID NO 13, или состоящая из нее.

10. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов.

11. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п.10, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса или рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV), в частности, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12, более конкретно, где вектор экспрессии нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV2.

12. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п.10 или 11, дополнительно содержащий:

- a) последовательность, кодирующую капсидный белок, и
- b) трансген.

13. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п.12, где трансген содержит последовательность под SEQ ID NO 16.

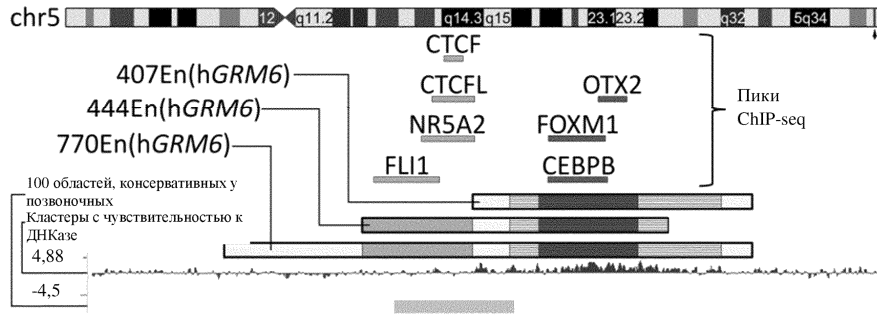
14. Вирионная частица аденоассоциированного вируса, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9 или вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-13.

15. Применение выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-13 или вирионной частицы аденоассоциированного вируса по п.14 в качестве лекарственного препарата.

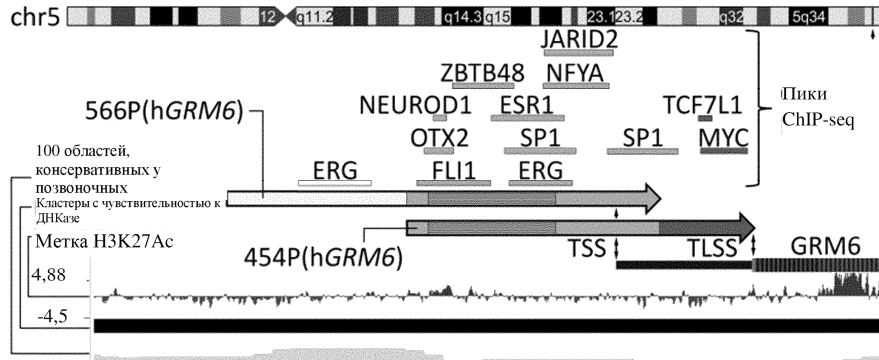
16. Применение выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, вектора экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-13 или вирионной частицы аденоассоциированного вируса по п.14 для лечения врожденной стационарной ночной слепоты (CSBN1), палочко-колбочковой и колбочко-палочковой дистрофий, пигментного ретинита или макулярной дегенерации.

17. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-13 или вирионная частица аденоассоциированного вируса по п.14, где указанные выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор экспрессии или вирионную частицу вводят посредством:

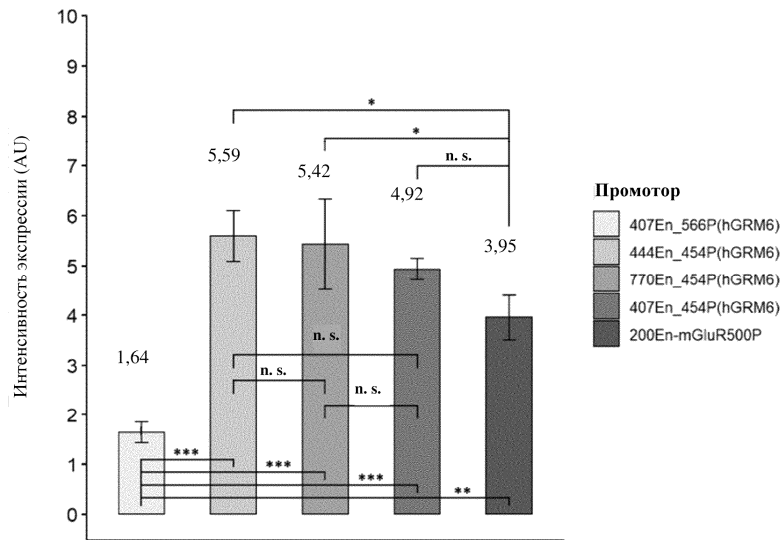
- a) интравитреального введения,
- b) интравитреальной инъекции, или
- c) субретинальной инъекции.



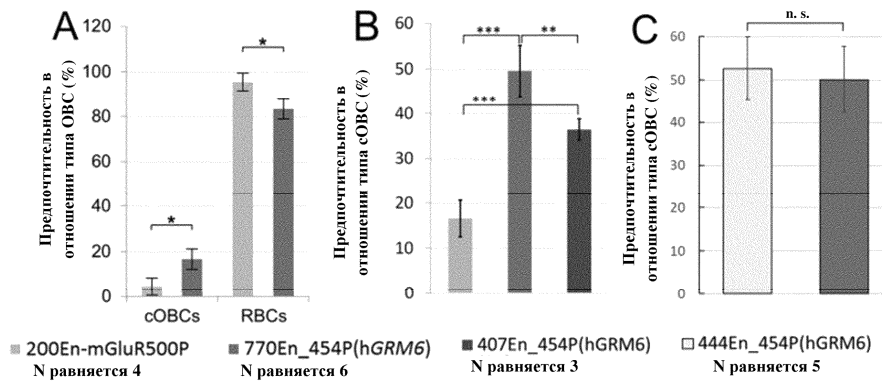
Фиг. 1А



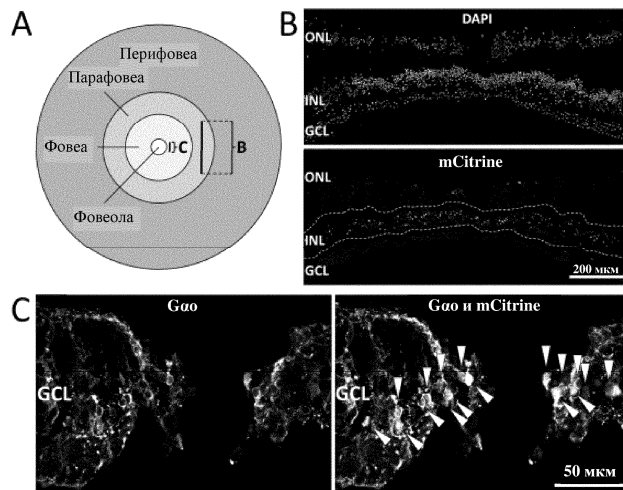
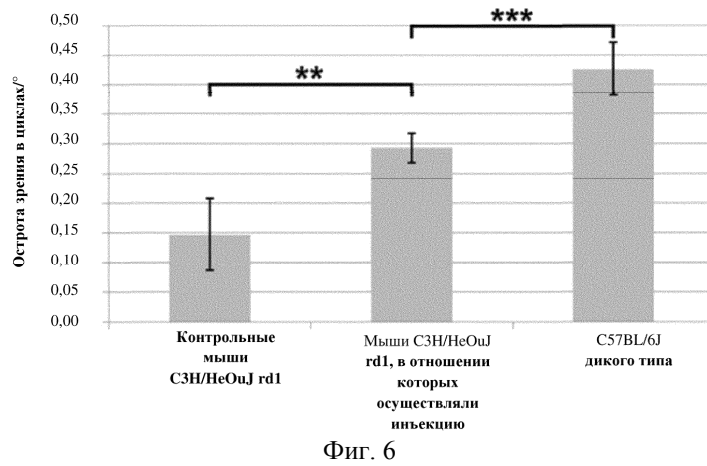
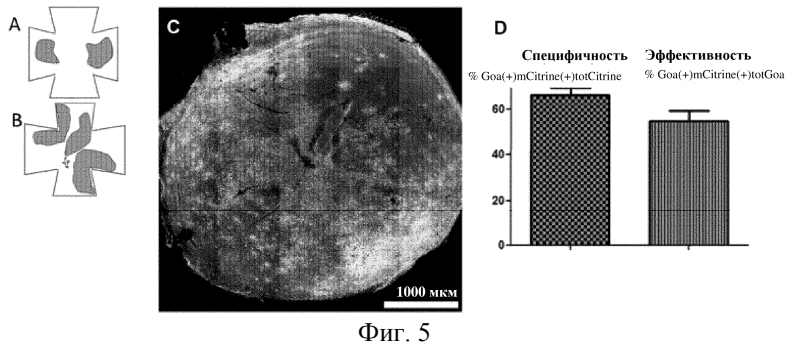
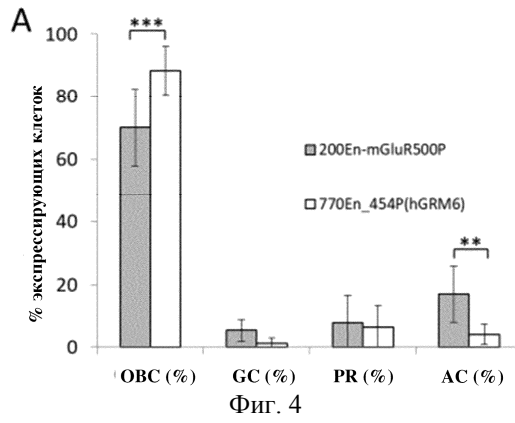
Фиг. 1В

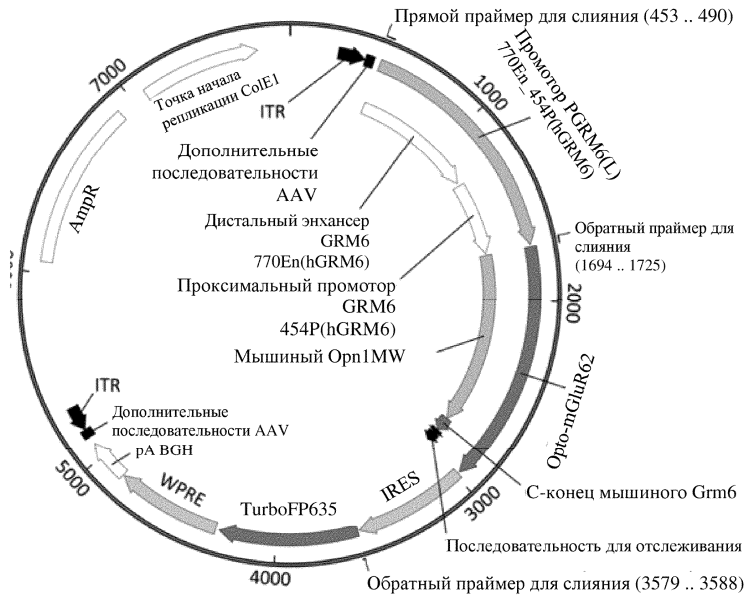


Фиг. 2

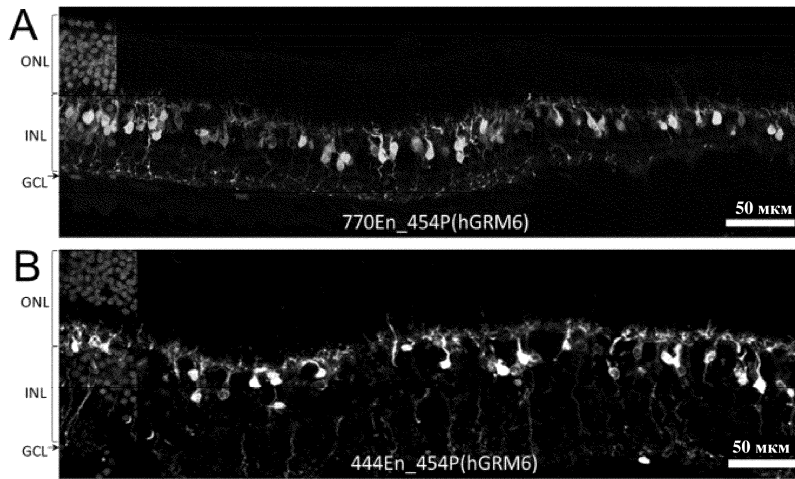


Фиг. 3





Фиг. 8



Фиг. 9