

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393346 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.05

(51) Int. Cl. C07K 14/70 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.19

(54) ВАРИАНТЫ KCVN2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/191,106

(32) 2021.05.20

(33) US

(86) PCT/US2022/030073

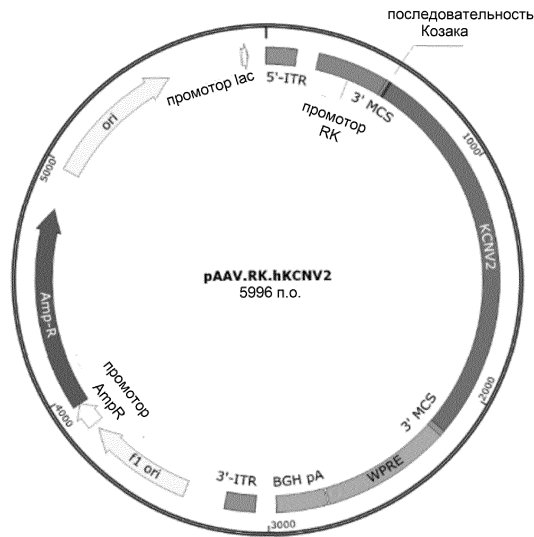
(87) WO 2022/246089 2022.11.24

(71) Заявитель:
АРТЕМА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Султанов Шамиль (GR), Султанова
Мария (CY), Карвальо Др. Ливия,
Хунт Дэвид, Рашван Рабаб (AU),
Волчков Павел (RU)

(74) Представитель:
Мягкова Е.Н. (RU)

(57) В настоящем документе раскрыты новые варианты полинуклеотида KCVN2, кодирующего полипептиды потенциалзависимых калиевых ионных каналов, и их применение, например, в способах восстановления функций фоторецепторов и лечения субъекта с заболеванием сетчатки, таким как CDSRR.



202393346

A1

A1

202393346

ВАРИАНТЫ KCNV2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым нуклеотидным и белковым последовательностям, таким как последовательности KCNV2, к молекулам рекомбинантных нуклеиновых кислот и векторам, содержащим их, а также к связанным с ними способам применения для лечения у субъекта заболеваний сетчатки, таких как дистрофия колбочек.

Сведения о предшествующем уровне техники

Дистрофия колбочек, например, но без ограничения, дистрофия колбочек со сверхнормальной реакцией палочек [CDSRR], представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, которое может характеризоваться, в частности, плохой остротой зрения, потерей зрения, чувствительностью к свету, плохим цветовым зрением, нистагмом и косоглазием и т.п. Проблемы со зрением начинаются в раннем детстве, когда острота зрения достигает, например, 20/100 или менее ко второму десятилетию жизни. Позже у пациентов может развиваться куриная слепота, а у многих или у большинства пациентов также может развиваться близорукость. Не существует никакого специфического лечения, которое могло бы уменьшить или предотвратить прогрессирование потери зрения, что приводит к плохим прогнозам, и в результате у пациентов с возрастом происходит снижение качества жизни. Таким образом, существует необходимость поиска терапии.

Сущность изобретения

В настоящем документе раскрыты новые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, белки, векторы и связанные с ними способы применения для лечения дистрофии колбочек со сверхнормальной реакцией палочек [CDSRR] (дистрофия колбочек сетчатки 3В, OMIM 610356) и родственных патологий, которые связаны с геном KCNV2. CDSRR представляет собой редкую рецессивную наследственную ретинопатию, которая характеризуется плохой остротой зрения (из-за центральной скотомы), светобоязнью, тяжелыми нарушениями цветового зрения, а в некоторых случаях нистагмом и косоглазием. У некоторых пациентов глазное дно выглядит нормальным, но сообщалось о фовеальной или парафовеальной атрофии, макулопатии типа «бычий глаз», гиперфлуоресцентных аномалиях и генерализованной мелкопигментной ретинопатии. В некоторых случаях может наблюдаться некоторая временная бледность диска зрительных нервов.

В настоящем документе раскрыты нуклеиновые кислоты, единицы транскрипционного контроля (TCU), оптимизированные генные последовательности, экспрессирующие конструкции и векторы для экспрессии генов в клетках сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы колбочек и/или фоторецепторы палочек.

В настоящем документе раскрыты модифицированные гены KCVN2, содержащие замены в нуклеиновой кислоте в немодифицированном гене KCVN2, где замена в нуклеиновой кислоте может представлять собой одну или несколько замен, идентифицируемых при выравнивании человеческого гена KCVN2 с оптимизированной по кодонам версией, представленного в SEQ ID NO: 2.

Также в настоящем документе раскрыты нуклеиновые кислоты, единицы транскрипционного контроля (TCU), оптимизированные генные последовательности, экспрессирующие конструкции и векторы для экспрессии генов в фоторецепторах, например, в фоторецепторах колбочек и/или в фоторецепторах палочек.

Также в настоящем документе раскрыты векторы, такие как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, а также изолированные белки Kv8.2, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты.

Также в настоящем документе раскрыты экспрессирующие конструкции, содержащие вариант человеческого гена KCVN2 под контролем TCU. В одном варианте осуществления изобретения вариант KCVN2 находится под контролем промотора, оптимизированного для экспрессии генов в фоторецепторах, например, в фоторецепторах колбочек или в фоторецепторах палочек. В другом варианте осуществления изобретения вариант человеческого гена KCVN2 может находиться под контролем промотора родопсинкиназы (RK).

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлены следующие объекты.

Промотор, способный управлять экспрессией гена KCVN2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор направляет экспрессию трансгена в фоторецепторах. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор ограничивает экспрессию только в фоторецепторах. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK).

Последовательность, которая будет экспрессироваться в фоторецепторе. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлена конструкция для экспрессии, содержащая последовательность, экспрессируемую специфичным для фоторецептора способом. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессируемая последовательность содержит ген, кодирующий Kv8.2. В

дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессируемая последовательность содержит SEQ ID NO: 2.

Вышеизложенные и другие варианты осуществления настоящего изобретения, их признаки и преимущества станут более понятными из нижеприведенного подробного описания нескольких вариантов осуществления изобретения со ссылками на прилагаемые фигуры.

Перечень фигур

На **Фиг. 1** показана схематическая карта первой конструкции.

На **Фиг. 2** показана схематическая карта второй конструкции.

На **Фиг. 3** показана схематическая карта третьей конструкции.

На **Фиг. 4** показана схематическая карта четвертой конструкции.

На **Фиг. 5** показан иллюстративный способ восстановления функции сетчатки.

На **Фиг. 6** представлена схема исследований на стадиях I и II.

На **Фиг. 7** представлена схема исследований на стадии III, подтверждающих правильность концепции.

На **Фиг. 8** представлено сравнение результатов, полученных у мышей, не получавших лечения, и у мышей, получавших лечение в соответствии со способом по изобретению, с использованием системы и нуклеотидной последовательности по изобретению.

На **Фиг. 9** показана относительная экспрессию маркерных генов для колбочек (A: аррестин колбочек) и для палочек (B: родопсин) в сетчатке дикого типа (WT, без обработки) по сравнению с сетчаткой после инъекции *P<0,05; *P<0,01.

На **Фиг. 10** показаны репрезентативные изображения экспрессии субъединицы Kv8.2 человека в сетчатке мышей Kv8.2 KO, которые получили SEQ ID NO: 2 с помощью SEQ ID NO: 3 для доставки, через 12 недель после обработки.

На **Фиг. 11** представлена Таблица с описанием схемы протокола пилотных исследований на мышах.

На **Фиг. 12** приведены результаты, показывающие амплитуду а-волны у мышей, получавших лечение, по сравнению с мышами, не получавшими лечения.

На **Фиг. 13** приведены результаты, показывающие амплитуду положительной b-волны у мышей, получавших лечение, по сравнению с мышами, не получавшими лечения.

На **Фиг. 14** приведены результаты ОКТ, полученные у мышей, получавших лечение, по сравнению с мышами, не получавшими лечения.

На **Фиг. 15** приведены результаты количественной оценки с-волны глаза, полученные у мышей дикого типа (WT), у мышей Kv8.2 КО (без обработки) и у мышей Kv8.2 КО после обработки глаза.

На **Фиг. 16** приведены результаты, показывающие улучшение фотопической и скотопической остроты зрения, а также скотопической контрастной чувствительности у получавших лечение мышей Kv8.2 КО, через 12 недель после лечения.

На **Фиг. 17** представлено изображение среза сетчатки глаза, подвергнутого субретинальной инъекции, с обработанной областью, где произошла экспрессия субъединицы человеческого Kv8.2 (зеленый), по сравнению с необработанной областью, где экспрессия Kv8.2 отсутствует.

На **Фиг. 18** представлены изображения обработанных и необработанных участков с большим увеличением, показывающие экспрессию Kv8.2 (зеленый), экспрессию Kv2.1 (красный) и ядра клеток (синий). Масштабная линейка соответствует 50 мкм.

На **Фиг. 19** представлены результаты количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR), показывающие экспрессию человеческого гена KCNV2 в обработанных глазах, нормализованные по отношению к дикому типу.

На **Фиг. 20** и **Фиг. 21** (рассматриваемые вместе) представлены результаты выравнивания последовательностей человеческого гена KCNV2 (SEQ ID NO: 11) и его оптимизированного по кодонам варианта SEQ ID NO: 2.

Перечень последовательностей

Нуклеиновые и аминокислотные последовательности, представленные в прилагаемом перечне последовательностей, показаны с использованием стандартных буквенных сокращений для нуклеотидных оснований и трехбуквенного кода для аминокислот, как определено в 37 CFR 1.822. Для каждой последовательности нуклеиновой кислоты показана только одна цепь, но при любой ссылке на показанную здесь цепь комплементарную ей цепь следует понимать как включенную. Перечень последовательностей представлен в виде текстового файла ASCII с названием «Sequence.txt» (~40 КБ), который был создан 18 мая 2022 г., и он включен в настоящий документ посредством ссылки.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Здесь раскрыты новые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, белки, векторы и связанные с ними способы, используемые для лечения дистрофии колбочек со сверхнормальной реакцией палочек [CDSRR] (дистрофия колбочек сетчатки 3B, OMIM

610356) и родственных патологий, которые связаны с геном KCVN2. CDSRR - редкая, рецессивная и наследственная ретинопатия, которая характеризуется низкой остротой зрения (из-за центральной скотомы), светобоязнью, тяжелыми нарушениями цветового зрения, а иногда также нистагмом и косоглазием. У некоторых пациентов с CDSRR глазное дно выглядит нормальным, но сообщалось о фовеальной или парафовеальной атрофии, макулопатии типа «бычий глаз», гиперфлуоресцентных аномалиях и генерализованной мелкопигментной ретинопатии. В некоторых случаях может наблюдаться некоторая временная бледность зрительных нервов.

Клинические симптомы могут ограничиваться потерей зрения без поражения других тканей или органов. Большинство правительственных учреждений юридически определяют слепоту как скорректированную остроту зрения (центральное зрение) с показателем 20/200 или хуже в глазу с наилучшим зрением. Это означает, что то, что «слепой» человек может видеть только на расстоянии до 20 футов, тогда как средний человек может ясно видеть на расстоянии 200 футов. Исследования в отношении CDSRR показали, что острота зрения может варьироваться от человека к человеку, со средним показателем остроты зрения приблизительно 20/160, но со временем этот показатель может достичь установленного законом уровня, определяющего «слепых». Не существует никакого специфического лечения, которое могло бы уменьшить или предотвратить прогрессирование потери зрения, что приводит к плохим прогнозам, и в результате у пациентов с возрастом происходит снижение качества жизни. Поскольку прогноз связан с вероятностью положительного результата лечения или с вероятностью излечения заболевания, то плохой прогноз для CDSRR и других патологий, связанных с KCVN2, означает, что шансов на выздоровление пациентов мало, поскольку в настоящее время не существует соответствующих лекарственных средств или методов лечения. Средства для слабовидящих и тонированные линзы являются единственными средствами, доступными пациентам для облегчения симптомов потери зрения. Несколько исследований указали на прогрессирующий характер потери центрального зрения у пациентов с CDSRRR, но крупномасштабные исследования естественного течения этого заболевания еще не завершены, и полные оценки степени прогрессирования это заболевания еще не получены.

Низкая встречаемость этого заболевания (по оценкам, число заболевших во всем мире составляет 1 на 1000000) позволяет отнести его к редким заболеваниям, что не позволяет фармацевтической промышленности заниматься разработкой средств и методов его лечения из-за отсутствия для частного сектора финансовых стимулов для разработки, производства и поставки на рынок новых лекарственных средств для лечения или предотвращения этого заболевания. Однако доступность электроретинографии (ЭРГ) и

генетического тестирования позволяет точно и рано диагностировать CDSRR, и это способствует разработке средств и методов лечения этого заболевания. Рецессивный тип наследования CDSRR и медленно прогрессирующий характер делают его хорошим кандидатом для однократного лечения методами генной терапии с использованием вирусов (метод генной добавки).

Мутация гена 2 потенциал-зависимого калиевого канала подсемейства V (KCVN2) является одной из ряда причин возникновения CDSRRR. У некоторых пациентов с CDSRRR имеются мутации в гене KCNV2, который кодирует субъединицу потенциалзависимого калиевого (K^+) канала Kv8.2. В настоящее время во всем мире идентифицировано более 95 различных вариантов KCNV2, вызывающих CDSRR, среди которых встречаются миссенс-мутанты, нонсенс-мутанты, мутанты с внутригенными делециями, мутанты со вставками вне рамки считывания, а также другие варианты. Было показано, что разные варианты по-разному влияют на Kv8.2: некоторые мутации приводят к образованию непроводящих каналов, тогда как другие мутации вообще блокируют образование каналов. Это предполагает существование различных механизмов, вовлеченных в патологию заболевания, и, учитывая, что все варианты приводят к образованию нефункционального белка, это является объективными предпосылками для признания CDSRR в качестве потенциального кандидата для заместительной генной терапии.

Kv8.2 является членом группы белков «модификаторов/молчащих» каналов, которые не образуют каналы сами по себе, но нуждаются в родственном партнере; для Kv8.2 это Kv2.1 (кодируемый геном KCNB1), который является членом семейства субъединиц Shab, генерирующих токи замедленного выпрямления, регулирующие скорость реполяризации потенциалов действия. В глазу субъединицы Kv8.2 и Kv2.1 расположены исключительно на цитоплазматической мембране внутренних сегментов фоторецепторных клеток, таких как колбочек и палочек, т.е. клеток, ответственных за инициацию каскада световой трансдукции зрительной реакции. Однако было показано, что миссенс-мутации в гене KCNV2 вызывают эпилепсию у людей, что указывает на то, что этот ген также может присутствовать в мозге. Фенотип электроретинограммы (ЭРГ) указывает на то, что мутации в KCNV2 приводят к потере функции субъединицы Kv8.2, что в свою очередь приводит к потере функциональности гетеромера Kv2.1/Kv8.2. В конечном итоге это изменяет чувствительность сетчатки к свету и, следовательно, приводит к изменению фундаментальных физиологических процессов, посредством которых динамический диапазон зрения модулируется при различных уровнях освещенности.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что мутации в KСNV2 влияют как на колбочки, так и на палочки, что отражается в аномалиях на электроретинограммах (ЭРГ) для обоих фоторецепторов, и они широко распространены по всей сетчатке, однако у некоторых пациентов наблюдаемые морфологические изменения оказываются более выраженными в колбочках. Визуализация сетчатки с высоким разрешением с использованием оптической когерентной томографии в спектральной области (SD-ОСТ или просто ОКТ) у пациентов с CDSRR выявила значительные морфологические аномалии, которые обычно встречаются в центральной части сетчатки. К ним относятся соединение внутреннего/наружного сегмента (IS/OS), уменьшение глубины фовеалы, нарушение мозаики фоторецепторов колбочек, выраженное в виде участков с отсутствием колбочек, и общее снижение плотности колбочек. Однако точные механизмы потери фоторецепторных клеток в сетчатке при CDSRR до сих пор неизвестны. При этом неясно, почему заболевание по-разному поражает колбочки и палочки. Недавнее исследование патологий у пациентов с CDSRRR, выполненное с помощью пупиллометрии, показало, что функция внутренней сетчатки может быть сохранена. Поэтому можно предположить, что терапия, направленная на восстановление функции внешней сетчатки, может быть успешной.

В настоящем документе раскрыты нуклеиновые кислоты, единицы транскрипционного контроля (TCU), оптимизированные генные последовательности, экспрессирующие конструкции и векторы для экспрессии генов в клетках сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы колбочек и/или фоторецепторы палочек.

В настоящем документе раскрыты модифицированные гены KСVN2, содержащие замены нуклеиновой кислоты в немодифицированном гене KСVN2 (SEQ ID NO: 12), где замена нуклеиновой кислоты может представлять собой одну или несколько замен, идентифицируемых при выравнивании человеческого гена KСVN2 с оптимизированной по кодонам версией, представленного в SEQ ID NO: 2.

Также в настоящем документе раскрыты нуклеиновые кислоты, единицы транскрипционного контроля (TCU), оптимизированные генные последовательности, экспрессирующие конструкции и векторы для экспрессии генов в фоторецепторах, например, в фоторецепторах колбочек и/или в фоторецепторах палочек.

В настоящем документе также раскрыты векторы, такие как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV вектор), содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, а также изолированные белки Kv8.2, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты.

Также в настоящем документе раскрыты экспрессирующие конструкции, содержащие вариант человеческого гена KСVN2 (SEQ ID NO: 2) под контролем TCU. В

этом варианте осуществления настоящего изобретения ген KCVN2 находится под контролем промотора, оптимизированного для экспрессии генов в фоторецепторах, например, в фоторецепторах колбочек или в фоторецепторах палочек. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант человеческого гена KCVN2 может находиться под контролем промотора родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6).

В настоящем документе также раскрыты варианты гена KCVN2, например с последовательностью SEQ ID NO: 2, с повышенной экспрессией гена по сравнению с соответствующим нативным человеческим геном KCVN2 (SEQ ID NO: 12). Варианты гена KCVN2 обладают улучшенными терапевтическими свойствами, включая улучшенную экспрессию, выраженную в том, что имеет место в среднем приблизительно 8-кратное увеличение экспрессии гена по сравнению с геном дикого типа, более высокая разница и значительное снижение положительных b-волн ЭРГ по сравнению с глазами без обработки, а также более высокая разница и значительное снижение положительных b-волн ЭРГ по сравнению с результатами, полученными при использовании других продуктов. Улучшенные свойства раскрытых здесь вариантов KCVN2 (например с последовательностью SEQ ID NO: 2) включают, но без ограничения, повышенную экспрессию по сравнению с соответствующим нативным человеческим геном KCVN2 (SEQ ID NO: 12), повышенную экспрессию по сравнению с соответствующим диким типом гена KCVN2 (SEQ ID NO: 12) и/или улучшенных фармакокинетических свойств по сравнению с соответствующим нативным человеческим геном KCVN2 (SEQ ID NO: 12). Улучшенные свойства могут включать улучшенную стабильность транскриптов и минимизацию аберрантного сплайсинга транскриптов.

В настоящем документе также раскрыты способы применения одной или нескольких нуклеиновых кислот, единиц транскрипционного контроля (TCU), оптимизированных генных последовательностей, экспрессирующих конструкций и векторов для лечения и/или предотвращения нарушений или дистрофий сетчатки, включая, но без ограничения, CDSRR.

Также в настоящем документе раскрыта AAV-опосредованная терапия по добавлению генов в случае KCNV2-ассоциированной дистрофии колбочек со сверхнормальной реакцией палочек.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено следующее.

Промотор, способный управлять экспрессией гена KCVN2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор направляет экспрессию трансгена в фоторецепторы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор

ограничивает экспрессию только в фоторецепторах. В другом варианте осуществления настоящего изобретения промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6).

Последовательность, которая будет экспрессироваться в фоторецепторе. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлена экспрессирующая конструкция, содержащая последовательность, предназначенную для экспрессии специфичным для фоторецептора способом. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессируемая последовательность содержит ген, кодирующий Kv8.2. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессируемая последовательность содержит SEQ ID NO: 2.

Вышеуказанные варианты осуществления настоящего изобретения и другие особенности и преимущества будут более ясными из следующего подробного описания нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения со ссылками на прилагаемые фигуры.

Термины и определения

Если не указано иное, технические термины используются здесь в соответствии с их общепринятыми значениями. Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в Krebs et al. (eds.), *Lewin's genes XII*, published by Jones & Bartlett Learning, 2017; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 2009 (ISBN 9780632021826). Термины, представленные в единственном числе, включают ссылки на их определения во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Выражение «содержит А или В» означает, что объект содержит или включает А или В, или А и В. Хотя подходящие способы и материалы, которые могут быть использованы на практике при осуществлении или тестировании настоящего изобретения, описаны ниже, тем не менее, могут быть использованы подобные или эквивалентные способы и материалы. Кроме того, описанные материалы, способы и представленные примеры носят исключительно иллюстративный характер, и они не предназначены для каких-либо ограничений. В случае противоречий преимущественную силу имеет настоящее описание, включая пояснения в отношении терминов. Чтобы облегчить рассмотрение различных вариантов осуществления настоящего изобретения, ниже предоставлены пояснения в отношении некоторых конкретных терминов.

«5'» и/или «3'»: Молекулы нуклеиновой кислоты (такие как ДНК и РНК) имеют **«5'-концы»** и **«3'-концы»**, поскольку мононуклеотиды вступают в реакцию с образованием полинуклеотидов таким образом, что 5'-фосфат пентозного кольца одного мононуклеотида

присоединяется к 3'-кислороду своего соседа в одном направлении посредством фосфодиэфирной связи. Следовательно, один конец линейного полинуклеотида называется «5'-концом», если его 5'-фосфат не связан с 3'-кислородом пентозного кольца мононуклеотида. Другой конец полинуклеотида называется «3'-концом», если его 3'-кислород не связан с 5'-фосфатом пентозного кольца другого мононуклеотида. Несмотря на то, что 5'-фосфат одного мононуклеотидного пентозного кольца присоединен к 3'-кислороду его соседа, можно сказать, что внутренняя последовательность нуклеиновой кислоты также имеет 5'- и 3'-концы.

В линейной или кольцевой молекуле нуклеиновой кислоты дискретные внутренние элементы называются «**расположенными против хода транскрипции**» или 5'-элементами по отношению к «**расположенным по ходу транскрипции**» или 3'-элементам. Что касается ДНК, эта терминология отражает то, что транскрипция происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу вдоль цепи ДНК. Элементы промотора и энхансера, которые управляют транскрипцией связанного гена, обычно расположены на 5'-конце или выше кодирующей области. Однако энхансерные элементы могут оказывать свое действие даже тогда, когда они расположены на 3'-конце от промоторного элемента и кодирующей области. Сигналы терминации транскрипции и полиаденилирования расположены на 3'-конце или ниже кодирующей области.

Аденоассоциированный вирус (AAV): небольшой, дефектный по репликации, безоболочечный вирус, который заражает человека и некоторых других видов приматов. Известно, что AAV не вызывает заболевания, и он вызывает очень слабый иммунный ответ. Векторы для генной терапии, в которых используются AAV, могут инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки, и они могут персистировать во внехромосомном состоянии, не интегрируясь в геном клетки-хозяина. Эти особенности делают AAV привлекательным вирусным вектором для генной терапии. В настоящее время существует 11 признанных серотипов AAV (AAV1 - AAV11).

Введение: предоставление субъекту агента, такого как терапевтический агент (например, рекомбинантный AAV), любым эффективным путем. Типичные пути введения включают, но без ограничения, инъекцию (например, подкожную, внутримышечную, внутрикожную, внутрибрюшинную и внутривенную), а также пероральный, внутривенный, сублингвальный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути введения.

кДНК (комплементарная ДНК): участок ДНК, в котором отсутствуют внутренние некодирующие сегменты (интроны) и регуляторные последовательности, детерминирующую транскрипцию. Молекулы кДНК синтезируются в лаборатории путем

обратной транскрипции из информационной РНК, экстрагированной из клеток. Молекулы кДНК также могут содержать нетранслируемые области (UTR), которые отвечают за контроль трансляции в соответствующей молекуле РНК.

KCNV2: человеческий ген KCNV2 (референсная последовательность NCBI: NM_133497.4; Ensembl gene ENSG00000168263.9 и транскрипт KCNV2-201 ENST00000382082.4) (SEQ ID NO: 1) выбран в качестве трансгена. Транскрипт KCNV2 имеет только один вариант сплайсинга и состоит из двух экзонов. Длина всего транскрипта составляет 2178 пар оснований, а длина кодирующей последовательности (CDS), использованной в качестве основы для последовательностей настоящего изобретения, составляет 1638 пар оснований (п.о.).

Оптимизированная по кодомам: нуклеиновая кислота, «оптимизированная по кодомам», относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая была изменена таким образом, что кодоны были оптимальными для экспрессии в конкретной системе (такой как конкретный вид или группа видов). Например, последовательность нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих или в конкретных видах млекопитающих (таких как клетки человека). Оптимизация кодонов не меняет аминокислотной последовательности кодируемого белка.

Контроль: референсный стандарт. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения контроль представляет собой образец отрицательного контроля, полученный от здорового пациента. В других вариантах осуществления контроль представляет собой положительный контрольный образец, полученный от пациента с диагнозом CDSRR. В других вариантах осуществления настоящего изобретения контроль представляет собой исторический контроль или стандартное референсное значение или диапазон значений (например, ранее протестированный контрольный объект/образец, например, группа пациентов с известным прогнозом или исходом, или группа образцов с исходными или нормальными значениями).

Различие между исследуемым объектом/образцом и контролем может быть как в сторону увеличения, так и, наоборот, в сторону уменьшения. Различие может быть качественным или количественным, например, статистически значимым. В некоторых примерах различие представляет собой увеличение или уменьшение относительно контроля, составляющее по меньшей мере приблизительно на 5%, например, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере

приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 100%, по меньшей мере приблизительно 150%, по меньшей мере приблизительно 200%, по меньшей мере приблизительно 250%, по меньшей мере приблизительно 300%, по меньшей мере приблизительно 350%, по меньшей мере приблизительно 400%, по меньшей мере приблизительно 500% или более 500%.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота): ДНК представляет собой длинноцепочечный полимер, который содержит генетический материал большинства живых организмов (но некоторые вирусы имеют гены, содержащие рибонуклеиновую кислоту (РНК)). Повторяющиеся звенья в полимерах ДНК представляют собой четыре различных нуклеотида, каждый из которых содержит одно из четырех оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т), связанные с сахаром дезоксирибозой, к которому присоединена фосфатная группа. Тройки нуклеотидов (называемые кодонами) кодируют каждую аминокислоту в полипептиде или стоп-сигнал. Термин «кодон» также используется для обозначения соответствующих (и комплементарных) последовательностей трех нуклеотидов в мРНК, в которые транскрибируется последовательность ДНК.

Если не указано иное, любая ссылка на молекулу ДНК охватывает обратную комплементарную последовательность к этой молекуле ДНК. За исключением случаев, когда в соответствии с текстом настоящего документа указывается одноцепочечная молекула, то молекулы ДНК, хотя и указаны таким образом, чтобы отражать только одну цепь, охватывают обе цепи двухцепочечной молекулы ДНК. Таким образом, отсылка на молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный белок или его фрагмент, охватывает как смысловую цепь, так и ее обратную комплементарную цепь. Например, зонды или праймеры целесообразно получать из обратной комплементарной последовательности раскрытых молекул нуклеиновой кислоты.

Экспрессия: транскрипция или трансляция последовательности нуклеиновой кислоты. Например, кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты (такая как ген) может экспрессироваться, когда ее ДНК транскрибируется в РНК или фрагмент РНК, который в некоторых примерах осуществления процессируется с образованием мРНК. Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты (такая как ген) также может экспрессироваться, когда ее мРНК транслируется в аминокислотную последовательность, такую как белок или фрагмент белка. В конкретном примере осуществления настоящего изобретения гетерологичный ген экспрессируется при его транскрипции в РНК. В другом примере осуществления настоящего изобретения гетерологичный ген экспрессируется, когда его РНК транслируется в аминокислотную последовательность. Регулирование экспрессии может включать контроль транскрипции, трансляции, транспорта и

процессинга РНК, деградацию промежуточных молекул, таких как мРНК, или активацию, инактивацию, компарментализацию или деградацию конкретных белковых молекул после их образования.

Последовательности контроля экспрессии: последовательности нуклеиновой кислоты, которые регулируют экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, с которой они функционально связаны. Последовательности контроля экспрессии функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, когда последовательности контроля экспрессии контролируют и регулируют транскрипцию и, при необходимости, трансляцию последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, последовательности контроля экспрессии могут включать соответствующие промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (ATG) перед геном, кодирующим белок, сигналы сплайсинга для интронов, поддержание правильной рамки считывания этого гена для обеспечения правильной трансляции мРНК, и стоп-кодона. Предполагается, что термин «контрольные последовательности» включает, как минимум, компоненты, присутствие которых может влиять на экспрессию, а также он может охватывать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, такие как лидерные последовательности и партнерские последовательности слияния. Последовательности контроля экспрессии могут включать промотор.

Ген: последовательность нуклеиновой кислоты, обычно последовательность ДНК, которая содержит контрольные и кодирующие последовательности, необходимые для транскрипции РНК, такой как мРНК или иной. Например, ген может содержать промотор, один или несколько энхансеров или сайленсеров, последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует РНК и/или полипептид, нижестоящие регуляторные последовательности и, возможно, другие последовательности нуклеиновой кислоты, участвующие в регуляции экспрессии мРНК.

Как хорошо известно в данной области техники, большинство эукариотических генов содержат как экзоны, так и интроны. Термин «**экзон**» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в геномной ДНК, которая, как биоинформатически предсказано и/или экспериментально подтверждено, вносит вклад в непрерывную последовательность зрелого транскрипта мРНК. Термин «**интрон**» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в геномной ДНК, которая, как предсказано и/или подтверждено, не вносит вклад в зрелый транскрипт мРНК, а скорее «сплайсируется» во время процессинга транскрипта.

Генная терапия: введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты в одну или несколько клеток-реципиентов, при этом экспрессия гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетке-реципиенте влияет на функцию клетки и приводит к терапевтическому эффекту у субъекта. Например, молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты может кодировать белок, который влияет на функцию клетки-реципиента.

Гибридизация. Анализы гибридизации для характеристики нуклеиновых кислот с определенным уровнем идентичности последовательностям нуклеиновых кислот, представленным в настоящем документе, хорошо известны в данной области; см., например, Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Термин «гибридизация» или «гибридируется», используемый в настоящем документе, может относиться к гибридизации в строгих или нестрогих условиях. Указанные условия гибридизации могут быть созданы в соответствии с общепринятыми протоколами, которые описаны в соответствующих разделах в Sambrook (2001) и в Ausubel (1989), или в Higgins and Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington D.C., (1985). Выбор и создание соответствующих условий находится в пределах компетенции специалиста, и это может быть осуществлено в соответствии с протоколами, известными в данной области техники. Таким образом, обнаружение гибридизующихся последовательностей обычно требует строгих условий гибридизации и промывки, таких как, например, условия, которые варьируются от $0,1 \times \text{SSC}$, $0,1\% \text{ SDS}$ при 65°C или $2 \times \text{SSC}$, 60°C , $0,1\% \text{ SDS}$ до, например, $6 \times \text{SSC}$, $1\% \text{ SDS}$ при 65°C . Как хорошо известно, длина зонда и состав определяемой нуклеиновой кислоты являются дополнительными параметрами для условий гибридизации.

Изолированный/выделенный: «изолированный» или «выделенный» биологический компонент (такой как молекула нуклеиновой кислоты, белок, вирус или клетка) представляет собой компонент, который в существенной степени отделен или очищен от других биологических компонентов клетки или ткани организма или самого организма, где этот компонент встречается в природе. К таким компонентам, в частности, относятся хромосомные и внехромосомные ДНК и РНК, белки и клетки. Молекулы нуклеиновой кислоты и белки, которые были «изолированы» или «выделены», включают те, которые были очищены стандартными методами очистки. Этот термин также охватывает молекулы нуклеиновых кислот и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные молекулы и белки нуклеиновых кислот.

Молекула нуклеиновой кислоты: полимерная форма нуклеотидов, которая может включать как смысловые, так и бессмысловые цепи РНК, кДНК, геномную ДНК, а также синтетические формы и смешанные полимеры вышеперечисленных молекул. Термин «нуклеотид» относится к рибонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду или модифицированной форме любого типа нуклеотида. Термин «молекула нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем документе, является синонимом «нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотида». Молекула нуклеиновой кислоты обычно имеет длину из не менее 10 оснований, если не указано иное. Этот термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК. Полинуклеотид может включать один или оба из встречающихся в природе и модифицированных нуклеотида, связанных вместе встречающимися в природе и/или не встречающимися в природе нуклеотидными связями. «кДНК» относится к ДНК, которая комплементарна или идентична мРНК, как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме. «Кодирование» относится к свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить матрицами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих либо определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК), либо имеющих определенную последовательность аминокислот, обеспечивая определенные ею биологические свойства.

Функционально связаны: Первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Обычно функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, когда необходимо соединить две области, кодирующие белок, они находятся в одной и той же рамке считывания.

Фармацевтически приемлемые носители. Используемые здесь фармацевтически приемлемые носители являются традиционными. В монографии Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed., London, UK: Pharmaceutical Press, 2013, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки векторов по изобретению.

В целом, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, композиции для парентерального введения обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают в качестве носителя фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. Для

твердых композиций (например, композиций в форме порошка, пилюли, таблетки или капсулы) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции (такие как композиции векторов), подлежащие введению, могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, буферные агенты для поддержания pH и т.п., например, таких как ацетат натрия или сорбитанмонолаурат. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения носитель, подходящий для введения субъекту, может быть стерильным и/или суспендированным или иным образом содержаться в единичной дозированной лекарственной форме, содержащей одну или несколько отмеренных доз композиции, подходящей для индукции желаемого иммунного ответа. Носитель также может быть дополнен лекарствами для использования лечебных целях. Единичная дозированная лекарственная форма может находиться, например, в запечатанном флаконе, содержащем стерильное содержимое, или в шприце для инъекции ее субъекту, или находиться в лиофилизированной форме для последующей сольубилизации ее и введения субъекту, или она может быть представлена в виде твердой дозированной формы или в виде дозированной формы с контролируемым высвобождением.

Очищенный: термин «очищенный» не предусматривает абсолютной чистоты продукта; это, скорее, относительный термин. Так, например, препарат очищенного белка представляет собой препарат, в котором белок (такой как белок KCVN2) более обогащен, чем пептид или белок в его естественной среде внутри клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения препарат очищают таким образом, чтобы целевой белок составлял по меньшей мере 50% от общего содержания белка в препарате.

Полипептид: любая цепь из аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования). «Полипептид» относится к полимерам аминокислот, включая полимеры аминокислот природного происхождения и полимеры аминокислот не природного происхождения, а также к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются ненативными аминокислотами, например, искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. «Остаток» относится к аминокислоте или миметику аминокислоты, включенному в полипептид посредством амидной связи или миметику амидной связи. Полипептид имеет аминоконцевой (N-концевой) конец и карбокси-концевой (C-концевой) конец. Термин «полипептид»

используется взаимозаменяемо с терминами «пептид» или «белок», и он используется здесь для обозначения полимера из аминокислотных остатков.

Предотвращение, лечение заболевания или облегчение течения заболевания: «предотвращение» заболевания (например, заболеваний сетчатки) означает подавление развития полного заболевания. Термин «лечение» относится к терапевтическому вмешательству, которое облегчает объективный признак или симптом заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. Термин «облегчение» относится к уменьшению количества или тяжести объективных признаков или симптомов заболевания.

Промотор: участок ДНК, который направляет/инициирует транскрипцию нуклеиновой кислоты (например, гена). Промотор включает необходимые последовательности нуклеиновой кислоты вблизи места начала транскрипции. Обычно промоторы расположены рядом с генами, которые они транскрибируют. Промотор также необязательно включает дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут располагаться на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от начального сайта транскрипции. Тканеспецифический промотор представляет собой промотор, который направляет/инициирует транскрипцию преимущественно в одном типе ткани или клетки. Например, **фоторецептор-специфичный промотор** представляет собой промотор, который направляет/инициирует транскрипцию в фоторецепторных клетках в существенно большей степени, чем в клетках других типов.

Белок: биологическая молекула, экспрессируемая геном или другой кодирующей нуклеиновой кислотой (например, кДНК), и состоящая из аминокислот.

Очищенный: термин «очищенный» не предусматривает абсолютной чистоты продукта; это, скорее, относительный термин. Так, например, очищенный пептид, белок, вирус или другое активное соединение представляет собой соединение, которое полностью или частично отделено от связанных белков и других примесей естественной среды его нахождения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин «по существу очищенный» относится к пептиду, белку, вирусу или другому активному соединению, которое было выделено из клетки, среды культуры клеток или другого неочищенного препарата, и которое подвергнуто фракционированию для удаления различных компонентов исходного препарата, такие как белки, остатки клеток и другие компоненты.

Рекомбинантный: молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты - это молекула, которая имеет последовательность, которая не встречается в природе, и которая, например, включает одну или несколько замен, делеций или вставок нуклеиновой кислоты, и/или

имеет последовательность, созданную искусственным сочетанием двух других отдельных сегментов последовательности. Это искусственное сочетание может быть достигнуто путем химического синтеза или, что чаще, путем искусственного манипулирования выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, с помощью методов генной инженерии.

Рекомбинантный вирус - это вирус, геном которого включает молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «**рекомбинантный AAV**» относится к частице AAV, в которую упакована молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты (такая как молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей Kv8.2).

Рекомбинантный белок - это белок, который имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, полученную путем искусственной комбинации двух иным образом разделенных сегментов последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок кодируется гетерологичной (например, рекомбинантной) нуклеиновой кислотой, которая была введена в клетку-хозяина, такую как бактериальная или эукариотическая клетка, или в геном рекомбинантного вируса.

Сетчатка. Сетчатка состоит из слоя клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) и трех слоев нейросенсорных клеток; а именно (от внешнего к внутреннему), внешний ядерный слой (содержащий палочки и 15 колбочек фоторецепторных клеток), внутренний ядерный слой (содержащий биполярные клетки) и слой ганглиозных клеток. Заболевания или дистрофии сетчатки можно определить как заболевания сетчатки, характеризующиеся прогрессирующей потерей фоторецепторных клеток и сопутствующей потерей зрения. Заболевания или дистрофии сетчатки могут быть наследственными заболеваниями или дистрофиями сетчатки.

Идентичность последовательностей: Идентичность или сходство между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или двумя или более аминокислотными последовательностями выражается в показателях идентичности или сходства между последовательностями. Идентичность последовательностей можно измерить в процентах идентичности; причем чем выше процент идентичности, тем более идентичны последовательности. Сходство последовательностей можно выразить в процентах (с учетом консервативных аминокислотных замен); причем чем выше процент сходства, тем более схожи последовательности. Гомологи или ортологи нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей обладают относительно высокой степенью идентичности/сходства последовательностей при выравнивании их с использованием стандартных методов. Эта гомология является более значимой, когда

ортологичные белки или кДНК происходят от близкородственных видов (например, человеческие и мышинные последовательности) по сравнению с видами, которые являются более отдаленно родственными (например, человеческие последовательности человека и последовательности из *C. elegans*).

Методы выравнивания последовательностей для их сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в следующих документах: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang et al. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; and Pearson et al., *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. В публикации Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, представлено подробное описание методов выравнивания последовательностей и методов расчета гомологии.

Программы для выравнивания, такая как Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990), доступны из ряда источников в интернете, включая Национальный центр биологической информации (NCBI), и они используются в сочетании с программами анализа последовательностей, такими как blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Дополнительную информацию в отношении этих программ можно найти на веб-сайте NCBI.

В настоящем документе указание в отношении идентичности, что она составляет «по меньшей мере 90%», относится к показателю, определяемому как «по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или даже 100% идентичности» по отношению к указанной референсной последовательности.

Субъект: живые многоклеточные позвоночные организмы, включая человека и млекопитающих, не относящихся к человеку.

Терапевтически эффективное количество: количество агента, такого как раскрытый здесь рекомбинантный AAV вектор, кодирующий KCVN2, достаточное для предотвращения, лечения (включая предотвращение), уменьшения и/или симптомов и/или основных причин нарушения или заболевания, для, например, предотвращения, лечения заболеваний сетчатки и/или для облегчения состояния при заболеваниях сетчатки. Например, это может быть количество рекомбинантного вектора AAV, кодирующего новый ген KCVN2, как описано в настоящем документе, которое продуцирует достаточное количество KCVN2 для восстановления функции фоторецептора.

В одном примере желаемым ответом является восстановление функции фоторецепторов у субъекта (такого как субъект с CDSRR), подтвержденное, например, по результатам электроретинограмметрии (ЭРГ). Чтобы метод был эффективным, электроретинограммы (зубцы a, b, c) не обязательно должны быть полностью восстановлены до состояния, характерного для ЭРГ нормальных здоровых людей без CDSRR. Например, введение терапевтически эффективного количества вектора (такого как вектор, кодирующий KCVN2), как описано в настоящем документе, может увеличить фотопическую или скотопическую b-волну ЭРГ на желаемую величину, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 100% или более, по сравнению с подходящим контролем.

Понятно, что для получения терапевтического ответа при заболевании или состоянии может потребоваться многократное введение терапевтического агента. Таким образом, терапевтически эффективное количество включает дробную дозу, которая в сочетании с предыдущим или последующим введением способствует достижению терапевтического ответа у пациента. Например, терапевтически эффективное количество агента можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз, например ежедневно, в течение всего курса лечения. Однако терапевтически эффективное количество может зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести и типа состояния, подвергаемого лечению, а также от способа введения. Единичная дозированная форма средства может быть представлена в терапевтическом количестве или в количествах, кратных терапевтическому количеству, например, во флаконе (например, с прокалываемой крышкой) или в шприце, содержащем стерильные компоненты.

Вектор: Вектор - это молекула нуклеиновой кислоты, позволяющая встроить чужеродную нуклеиновую кислоту без нарушения способности вектора реплицироваться и/или интегрироваться в клетку-хозяина. Вектор может включать последовательности нуклеиновой кислоты, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, например, он может включать ориджин репликации. Вектор также может включать один или несколько генов маркеров селекции и другие генетические элементы. Вектор экспрессии представляет собой вектор, который содержит необходимые регуляторные последовательности, обеспечивающие транскрипцию и трансляцию вставленного гена или генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV вектор). В некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой гамма-ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор.

Новый ген KCVN2

В настоящем документе раскрыта молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок с активностью Kv8.2, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную как последовательность SEQ ID NO: 2, или содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична этой последовательности.

В настоящем документе раскрыта молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с комплементарной цепью нуклеотидной последовательности, представленной как последовательность SEQ ID NO: 2, или с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична этой последовательности.

В настоящем документе раскрыта молекула вырожденной нуклеиновой кислоты, образованной в результате вырождения генетического кода нуклеотидной последовательности, представленной как последовательность SEQ ID NO: 2, или с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична этой последовательности.

Как обсуждается в Примере 1, нуклеотидная последовательность, кодирующая Kv8.2, была оптимизирована по кодонам для улучшения ее экспрессии. Типичная оптимизированная последовательность KCVN2 представлена как последовательность SEQ ID NO: 2.

В настоящем документе раскрыты варианты гена KCVN2 с повышенной экспрессией по сравнению с соответствующим нативным человеческим геном KCVN2. Ген с последовательностью SEQ ID NO: 2 обладает улучшенными терапевтическими свойствами, включая улучшенное терапевтическое действие на свойства фоторецепторов, по сравнению с немодифицированным геном KCVN2, включая человеческий ген KCVN2 дикого типа, представленный последовательностью SEQ ID NO: 1, и с кодирующей областью, представленной в SEQ ID NO: 12. Улучшенные свойства раскрытых вариантов KCVN2 включают, но без ограничения, повышенный уровень синтеза белка, большую стабильность мРНК, увеличенную скорость элонгации трансляции и/или улучшенные

фармакокинетические свойства. Улучшенные свойства могут включать стабильную экспрессию трансгена и белка, ускоренное восстановление и улучшение зрительной функции.

Вариант полинуклеотида KCVN2 может быть определен как любой вариант на основе последовательности SEQ ID NO: 2, включая варианты последовательностей нуклеиновой кислоты, встречающиеся в природе. Вариант может быть определен как полинуклеотид с последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, при этом полипептид, который транслируется из этой вариантной последовательности, сохраняет свою функциональность. Вариант может быть определен как полинуклеотид с последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, и при этом полипептид, который транслируется из вариантной последовательности характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, и этот полипептид обладает способностью восстанавливать функцию фоторецепторов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариант полинуклеотида представляет собой оптимизированный по кодонам вариант кодирующей последовательности.

Экспрессионные конструкции по изобретению, раскрытые в настоящем документе, могут восстанавливать функцию фоторецепторов колбочек. Восстановление функции фоторецепторов колбочек можно определить как восстановление по меньшей мере приблизительно на 10%, на 20%, на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% или на 100% функции фоторецепторов колбочек. Функцию фоторецепторов колбочек можно анализировать с помощью любого подходящего стандартного метода, известного специалисту в данной области, например, с помощью электроретинографии (ЭРГ) реакций сетчатки. Функцию фоторецепторов палочек можно анализировать с помощью любого подходящего стандартного метода, известного специалисту в данной области, например, с помощью ЭРГ-анализа реакций сетчатки.

Восстановление функции фоторецепторов также можно определить как продление выживания фоторецепторов. Продление выживания фоторецепторов можно определить как увеличение времени, в течение которого фоторецептор (например, фоторецептор колбочки и/или фоторецептор палочки) функционирует или присутствует на уровне, составляющем приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% или более 100% по сравнению с фоторецептором, пораженным дистрофией. Примеры продления выживания фоторецепторов также включают улучшение активности,

определяемой по ЭРГ, или замедление потери активности, определяемой по ЭРГ, улучшение чувствительности сетчатки или замедление/остановку прогрессирующей потери чувствительности сетчатки, замедление или остановку потери фоторецепторных клеток, замедление или остановку истончения наружного слоя сетчатки, улучшение зрения или замедление/прекращение процесса потери зрения.

Экспрессионная конструкция может содержать одну или несколько единиц транскрипционного контроля, функционально связанных с геном KCVN2. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ген KCVN2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ген KCVN2 оптимизирован по кодонам.

Таким образом, в настоящем документе раскрыты молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекулы кДНК или РНК), кодирующие Kv8.2, а также очищенные формы Kv8.2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновой кислоты могут экспрессироваться в клетке-хозяине (такой как клетка млекопитающего) продуцируя в итоге Kv8.2.

Генетический код можно использовать для конструирования множества функционально эквивалентных последовательностей нуклеиновых кислот, таких как нуклеиновые кислоты, которые различаются по последовательности, но кодируют одну и ту же полипептидную последовательность.

Молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены любым подходящим способом, включая, например, клонирование соответствующих последовательностей или прямой химический синтез с использованием стандартных методов. Химический синтез приводит к получению одноцепочечного олигонуклеотида. Его можно превратить в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью или путем полимеризации с помощью ДНК-полимеразы, используя одноцепочечную ДНК в качестве матрицы.

Типичные нуклеиновые кислоты можно получить методами клонирования. Описания примеров подходящих методов клонирования и секвенирования можно найти в монографиях, например, в Green and Sambrook (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) и в Ausubel et al. (Eds.) (*Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, 2017, с дополнениями).

Нуклеиновые кислоты также можно получить методами амплификации. Методы амплификации включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (ЛЦР), систему амплификации на основе транскрипции (TAS) и систему репликации самоподдерживающейся последовательности (3SR).

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть экспрессированы в клетках, полученных рекомбинантной инженерией, таких как клетки бактерий, растений, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Последовательности ДНК, раскрытые в настоящем документе, могут быть экспрессированы *in vitro* путем переноса ДНК в подходящую клетку-хозяина. Клетка может быть прокариотической или эукариотической. Для экспрессии раскрытых здесь новых нуклеотидных последовательностей можно использовать многочисленные системы экспрессии, доступные для экспрессии белков, включая *E.coli*, другие бактерии-хозяева, дрожжи и различные высшие эукариотические клетки, такие как клеточные линии COS, CHO, HeLa и миеломы. Способы стабильного переноса, обеспечивающие постоянное сохранение в хозяине чужеродной ДНК, известны в данной области.

Экспрессия раскрытых здесь нуклеиновых кислот может быть достигнута путем функционального связывания ДНК или кДНК с промотором (который является либо конститутивным, либо индуцибельным) с последующим включением в кассету экспрессии. Промотор может представлять собой любой представляющий интерес промотор, включая специфичный для фоторецептора промотор, такой как промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6). Другие типичные промоторы включают, но без ограничения, CAG (гибридный ранний энхансер CMV/промотор β -актина курицы), CBA (промотор куриного β -актина), CBh (гибридная форма промотора CBA), CMV (промотор цитомегаловируса человека), CB (регуляторный элемент, состоящий из немедленного раннего энхансера цитомегаловируса (CMV), куриного промотора β -актина с первым соединением интрона/экзона, гибридного куриного β -актина и соединения интрона/экзона β -глобулина кролика), CBSB (содержащий более короткую последовательность немедленного участка энхансера CMV), чем промотор CB), GRK1 (промотор киназы 1, связанной с G-белком человека), pRLBP1 (промотор укороченного человеческого ретинальдегидсвязывающего белка 1 (RLBP1)), hCAR (промотор аррестина колбочек человека, PR1.7 и PR2.1 (варианты промоторов L-опсина человека)), IRBP (энхансер межфоторецепторного ретиноидсвязывающего белка человека), RS/IRBP (комбинация проксимального промотора ретиношизина человека и энхансера интерфоторецепторного ретиноидсвязывающего белка человека), pRHO (промотор родопсина) и hPDE6b (короткий промотор фосфодиэстеразы человека 6b).

В конструкцию необязательно может быть включен регуляторный элемент, такой как любая одна или несколько консенсусных последовательностей Козака (SEQ ID NO: 8), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) (SEQ ID NO: 9); и/или последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH

поли(A)) (SEQ ID NO: 10). Кассеты могут быть пригодны для репликации и интеграции как в прокариоты, так и в эукариоты. Типичные кассеты экспрессии содержат специфические последовательности, полезные для регуляции экспрессии ДНК, кодирующей белок. Например, кассеты экспрессии могут включать соответствующие промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации, стартовый кодон (т.е. ATG) перед геном, кодирующим белок, сигналы сплайсинга для интронов, последовательности для поддержания правильной рамки считывания этого гена, чтобы обеспечить правильную трансляцию мРНК и стоп-кодонов. Вектор также может кодировать маркер селекции, такой как маркер, кодирующий устойчивость к лекарственному средству (например, устойчивость к ампициллину или тетрациклину).

Чтобы получить высокий уровень экспрессии клонированного гена, желательно сконструировать кассеты экспрессии, которые содержат, например, сильный промотор для контроля и управления транскрипцией, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции (например, внутренние последовательности связывания рибосом) и терминатор транскрипции/трансляции. Для *E. coli* кассеты экспрессии могут включать промотор, такой как промоторы T7, trp, lac или лямбда, сайт связывания рибосомы и предпочтительно сигнал терминации транскрипции. Для эукариотических клеток контрольные последовательности могут включать промотор и/или энхансер, полученный, например, из гена иммуноглобулина, HTLV, SV40 или цитомегаловируса, и последовательность полиаденилирования, и они могут дополнительно включать донорные и/или акцепторные последовательности сплайсинга (например, акцепторные и донорные последовательности сплайсинга CMV и/или HTLV). Кассеты можно переносить в выбранную клетку-хозяина хорошо известными способами, такими как трансформация или электропорация для *E. coli*, и обработка фосфатом кальция, электропорация или липофекция для клеток млекопитающих. Клетки, трансформированные кассетами, можно отбирать по устойчивости к антибиотикам, придаваемой генами, содержащимися в кассетах, такими как гены amp, GPt, neo и hyg.

В нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный здесь полипептид, могут быть внесены модификации без снижения биологической активности. Некоторые модификации могут быть сделаны для облегчения клонирования, экспрессии или для включения в слитый белок нацеливающей молекулы. Такие модификации включают, например, кодоны терминации, последовательности для создания удобно расположенных сайтов рестрикции и последовательности для добавления метионина на аминоконце для обеспечения функционирования сайта инициации или последовательности для добавления дополнительных аминокислот (таких как поли His) для облегчения стадий очистки.

После экспрессии раскрытый здесь полипептид Kv8.2 может быть очищен стандартными методами, используемыми в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, методы с аффинными колонками, методы колоночной хроматографии и т.п. (см. общую информацию в Simpson et al. (Eds.), *Basic methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009). Раскрытые здесь полипептиды не обязательно должны быть на 100% чистыми. После очистки, частичной или до желаемой степени гомогенности, достаточной для использования пептидов в терапевтических целях, очищенные полипептиды должны быть по существу свободными от эндотоксина.

Рекомбинантные векторы и их применение в генной терапии

В современной практике генная терапия подразумевает функциональную замену дисфункционального гена, который не вырабатывает функциональный белок, копией дикого типа, которая восстанавливает эту функцию. Генная терапия является многообещающим подходом в лечении наследственных и распространенных сложных заболеваний сетчатки, а доклинические и клинические исследования подтвердили возможность использования векторов на основе аденоассоциированных вирусов (AAV векторов) в качестве безопасного и эффективного средства доставки генов. Заместительная генная терапия, опосредованная AAV векторами, была реализована для различных тканей и системных органов, включая печень, мышцы, клетки крови и сетчатку.

На нескольких животных моделях наследственной дегенерации фоторецепторов проведено успешное лечение с помощью генной терапии, и на сегодняшний день восстановление зрения достигнуто на морфологическом, функциональном и поведенческом уровнях. В настоящее время или завершено 43 клинических исследования, в которых используются или использовались системы доставки на основе AAV в качестве средства коррекции генетических дефектов при различных типах наследственных заболеваний сетчатки (сайт clinicaltrials.gov, поиск завершен 16 ноября 2020 г.). Еще в пяти клинических испытаниях (три текущих и два завершенных) также используются или были использованы AAV для лечения возрастной дегенерации желтого пятна.

Было показано, что AAV векторы являются приемлемым средством для доставки и нацеливания на фоторецепторные клетки, как по показателям эффективности, так и по своей специфичности. Было показано, что AAV векторы обладают высоким сродством к фоторецепторным клеткам, и они также обладают нетоксичным, непатогенным и низкоиммуногенным профилем. Это было подтверждено успешным применением генной терапии в моделях заболеваний сетчатки и потери зрения. Среди различных доступных в

настоящее время серотипов AAV для воздействия на клетки сетчатки наиболее часто используемыми являются серотипы AAV2/2, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/5, AAV2/7m8, AAV2/Anc80_L065.

Любая из обсуждавшихся выше молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть включена в вектор (такой как AAV вектор) для экспрессии в клетке или субъекте.

Последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе, применимы при получении векторов (таких как gAAV векторы), и они также применимы в бессмысловых векторах доставки, в векторах для генной терапии или в вакцинных векторах. В некоторых вариантах настоящее изобретение относится к векторам доставки генов и клеткам-хозяевам, которые содержат последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выбранный вектор может быть доставлен субъекту любым подходящим способом, включая внутривенную инъекцию, трансдукцию *ex vivo*, трансфекцию, электропорацию, доставку с помощью липосом, с использованием методов слияния мембран, доставку с помощью высокоскоростных частиц с ДНК покрытием, вирусную инфекцию или с помощью метода слияния протопластов, чтобы ввести трансген субъекту.

В некоторых вариантах настоящее изобретение относится к вирусным частицам, например, капсидам, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты гена KCVN2 (SED ID NO: 2), раскрытые в настоящем документе. Вирусные частицы, капсиды и рекомбинантные векторы полезны для доставки последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-мишень. Нуклеиновые кислоты можно легко использовать в различных векторных системах, капсидах и клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновые кислоты находятся в векторах, содержащихся в капсиде, содержащем Сар-белки, включая капсидные белки AAV vp1, vp2, vp3 и гипервариабельные области.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности нуклеиновой кислоты гена KCVN2 могут быть частью любого генетического элемента (вектора), который может обеспечить доставку его в клетку-хозяина, например, такого как голая ДНК, плаزمид, фаг, транспозон, космида, эписома, белок в виде невирусного носителя (например, в виде носителя на основе липидов), вирус и т.д., которые переносят включенные в них последовательности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор на основе лентивируса (содержащий лентивирусные гены или последовательности), например, вектор, имеющий последовательности нуклеиновой

кислоты, полученные из псевдотипов VSVG или GP64 или из обоих. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности нуклеиновой кислоты, полученные из псевдотипов VSVG или GP64, могут представлять собой по меньшей мере один, два или более генов или фрагментов генов, содержащих более 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50 или 25 непрерывных нуклеотидов, или нуклеотидных последовательностей, которые более чем на 50, на 60, на 70, на 80, на 90, на 95 или на 99% идентичны последовательности гена или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности нуклеиновой кислоты и промотора, раскрытые в настоящем документе, применимы для получения векторов AAV. AAV принадлежат семейству *Parvoviridae* и роду *Dependovirus*. AAV представляет собой небольшой вирус без оболочки, который содержит линейный одноцепочечный ДНК-геном. Как смысловая, так и антисмысловая цепи ДНК в AAV упакованы в капсиды AAV с одинаковой частотой. Геном AAV характеризуется двумя инвертированными терминальными повторами (ITR), которые фланкируют две открытые рамки считывания (ORF). Например, в геноме AAV2 первые 125 нуклеотидов ITR представляют собой палиндром, который складывается сам по себе, максимизируя спаривание оснований, и образует Т-образную шпильку. Остальные 20 оснований ITR, называемые последовательностью D, остаются неспаренными. ITR представляют собой *цис*-действующие последовательности, важные для репликации ДНК AAV; ITR является ориджином репликации, и он служит праймером для синтеза ДНК-полимеразой второй цепи. Двухцепочечная ДНК, образующаяся во время этого синтеза, которая называется мономером реплицирующейся формы, используется для второго раунда самопраймирующейся репликации, образуя димер реплицирующейся формы. Эти двухцепочечные промежуточные продукты процессируются посредством механизма смещения цепи, в результате чего одноцепочечная ДНК используется для упаковки, а двухцепочечная ДНК используется для транскрипции. Внутри ITR расположены элементы привязки Rep и сайт концевой расщепления (TRS). Эти структурные особенности используются во время репликации AAV для обработки двухцепочечных промежуточных продуктов вирусным регуляторным белком Rep. Помимо своей роли в репликации AAV, ITR также важен для упаковки генома AAV, транскрипции, негативной регуляции в непермиссивных условиях и для сайт-специфической интеграции (Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

AAV векторы обычно содержат кассету экспрессии трансгена между ITR, которая заменяет гены Rep и Cap. Векторные частицы получают путем котрансфекции клеток плазмидой, содержащей векторный геном и упаковывающую/хелперную конструкцию,

которая экспрессирует белки Rep и Cap в трансгене. Во время инфекции геномы векторов AAV проникают в ядро клетки и могут сохраняться там в нескольких молекулярных состояниях. Одним из распространенных результатов является преобразование генома AAV в двухцепочечную кольцевую эписому путем синтеза второй цепи или комплементарного спаривания цепей.

Векторы AAV, раскрытые здесь, обычно имеют рекомбинантный геном, содержащий следующую структуру:

(5' AAV ITR) - (промотор) - (трансген) - (3' AAV ITR)

Как обсуждалось выше, эти рекомбинантные AAV векторы содержат кассету экспрессии трансгена между ITR, которая заменяет гены Rep и Cap. Векторные частицы получают, например, путем котрансфекции клеток плазмидой, содержащей рекомбинантный векторный геном и упаковывающую/хелперную конструкцию, которая экспрессирует белки Rep и Cap в трансгене.

Трансген может быть фланкирован регуляторными последовательностями, такими как 5'-последовательность Козака и/или 3'-сигнал полиаденилирования.

ITR из AAV и другие выбранные компоненты AAV, описанные в настоящем документе, могут быть выбраны из AAV любого серотипа, включая, но без ограничения, AAV1, AAV2, AAV2-QuadyF, AAV2.7m8, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV8(Y733F), AAV9, Anc80, AAV7m8, AAVrh10, AAV-PHP.eB, AAV-PHP.S, AAV-DJ, AAV-DJ/8, AAV2.GL, AAV2.NN, AAVAnc80_L065 и любые их функциональные варианты. Эти ITR или другие компоненты AAV можно легко выделить из конкретного серотипа AAV с использованием методов, известных и доступных специалистам в данной области. Такой AAV может быть выделен или получен из академических, коммерческих или общедоступных источников (например, из Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния). Альтернативно, последовательности AAV можно получить синтетическими или другими подходящими способами со ссылкой на опубликованные последовательности, такие как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank, PubMed или подобных. Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает использование генома AAV других серотипов, которые еще не идентифицированы или не охарактеризованы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения геном рекомбинантного вектора AAV может иметь специфичный для фоторецептора промотор, такой как родопсинкиназа (RK) или любые ее модификации. Геном рекомбинантного вектора AAV может иметь любой промотор, известный в данной области техники, включая те, которые раскрыты здесь и/или те, которые раскрыты в Kaneshiro, K., Wu, Z., Li, T.,

Sieving, P., & Colosi, P., Evaluation of Viral and Human Retinal Promoters in AAV8 Vectors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(14), 491 (2011).

В настоящее время AAV является одним из наиболее часто используемых вирусов для генной терапии. Хотя AAV инфицирует людей и приматов некоторых других видов, и вызывает очень слабый иммунный ответ, неизвестно, вызывает ли он заболевание. Векторы генной терапии, использующие AAV, могут инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки и персистировать во внехромосомном состоянии, не интегрируясь в геном клетки-хозяина. Ввиду преимуществ AAV настоящее изобретение предполагает использование AAV для конструкций молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты и для способов, раскрытых в настоящем документе.

AAV обладает несколькими желательными свойствами, необходимыми для вектора генной терапии, включая способность связываться и проникать в клетки-мишени, проникать в ядро, способность экспрессироваться в ядре в течение длительного периода времени и низкую токсичность. Однако небольшой размер генома AAV ограничивает размер гетерологичной ДНК, которая может быть включена в него. Чтобы минимизировать эту проблему, были созданы AAV векторы, которые не кодируют Rep и элемент эффективности интеграции (ИЕЕ). ITR сохраняются, поскольку они представляют собой цис-сигналы, необходимые для упаковки (Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

Известны способы получения гAAV, пригодных для генной терапии (см., например, патентные заявки США № 2012/0100606, 2012/0135515, 2011/0229971 и 2013/0072548; а также публикацию Ghosh et al., *Gene Ther* 13(4):321-329, 2006), и гAAV может быть использован с молекулами рекомбинантной нуклеиновой кислоты для способов, раскрытых в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновые кислоты, раскрытые в настоящем документе, являются частью кассеты экспрессии или трансгена. См., например, публикацию патента США № 2015/0139953. Кассета экспрессии состоит из трансгена и регуляторных последовательностей, например, промотора и 5'- и 3'-инвертированных концевых повторов AAV (ITR). В одном варианте осуществления настоящего изобретения используются ITR из AAV серотипа 2 или 8. Однако можно выбрать ITR из других подходящих серотипов. Кассета экспрессии обычно упаковывается в капсидный белок и доставляется в выбранную клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), имеющего капсид серотипа AAV или его часть. Такой способ предусматривает культивирование клетки-

хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок серотипа аденоассоциированного вируса (AAV); функциональный представительный ген; кассету экспрессии, состоящую из инвертированных концевых повторов AAV (ITR) и трансгена; и достаточные хелперные функциональные последовательности, позволяющие упаковывать кассету экспрессии в капсидный белок AAV. См., например, публикацию патента США № 2015/0139953.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены рекомбинантные векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты специфичного для фоторецептора промотора в функциональной комбинации с трансгеном. Трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную векторным последовательностям, фланкирующим трансген, который кодирует Kv8.2, как описано в настоящем документе, и необязательно один или несколько дополнительных белков, представляющих интерес. Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами, обеспечивающими трансгенную транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке-хозяине.

Кассета экспрессии может быть помещена в любой подходящий вектор, например, в плазмиду, которая доставляется в клетку-хозяина. Плазмиды, полезные для осуществления настоящего изобретения, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были пригодны для репликации и, необязательно, интеграции в прокариотические клетки, клетки млекопитающих или в те и другие. Эти плазмиды (или другие векторы, несущие 5'-AAV ITR-гетерологичную молекулу-3'-ITR) содержат последовательности, обеспечивающие репликацию кассеты экспрессии в эукариотах и/или прокариотах, и маркеры селекции для этих систем. Предпочтительно молекулу, несущую кассету экспрессии, трансфицируют в клетку, где она может транзистентно существовать. Альтернативно, кассета экспрессии (несущая 5'-AAV ITR-гетерологичную молекулу - 3'-ITR) может быть стабильно интегрирована в геном клетки-хозяина либо в хромосому, либо находиться в виде эписомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кассета экспрессии может присутствовать в нескольких копиях, необязательно в конкатамерах типа «голова к голове», «голова к хвосту» или «хвост к хвосту». Подходящие методы трансфекции известны, и они могут быть использованы для доставки кассеты экспрессии в клетку-хозяина.

Обычно при доставке путем трансфекции вектора, содержащего кассету экспрессии, вектор и относительные количества векторной ДНК, вводимой в клетки-хозяева, можно регулировать с учетом таких факторов, как выбранный вектор, способ доставки и выбранные клетки-хозяева. В дополнение к кассете экспрессии сама клетка-хозяин

содержит последовательности, которые управляют экспрессией капсидного белка AAV в клетке-хозяине, и Rep-последовательности для того же серотипа, что и серотип AAV для ITR, представленный в каскаде экспрессии, или перекрестно-дополняющие последовательности для серотипа. Хотя молекула(ы), обеспечивающие Rep и Cap, могут транзientно существовать в клетке-хозяине (за счет трансфекции), предпочтительно, чтобы один или оба белка Rep и Cap, также как и промотор(ы), контролирующие их экспрессию, стабильно экспрессировались в клетке-хозяине, например, когда молекулы, обеспечивающие Rep и Cap, представлены в виде эписомы или когда они интегрированы в хромосому клетки-хозяина.

Введение вектора в клетку-хозяина может быть достигнуто любыми способами, известными в данной области техники или описанными выше, включая среди прочих, трансфекцию, инфицирование, электропорацию, ведение с помощью липосом, с использованием методов слияния мембран, ведение с помощью высокоскоростных частиц с ДНК покрытием, вирусную инфекцию или ведение с помощью метода слияния протопластов. Один или несколько аденовирусных генов могут быть стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина, стабильно экспрессироваться как эписомы или экспрессироваться транзientно. Все генные продукты могут экспрессироваться транзientно на эписоме или из стабильно интегрированных форм, или некоторые из генных продуктов могут экспрессироваться стабильно, тогда как другие экспрессируются транзientно. Кроме того, промоторы для каждого из аденовирусных генов могут быть выбраны независимо из конститутивного промотора, индуцибельного промотора или нативного аденовирусного промотора. Промоторы могут регулироваться, например, конкретным физиологическим состоянием организма или клетки (например при состоянии дифференцировки или в реплицирующихся или покоящихся клетках) или экзогенно добавленными факторами.

Методы с использованием AAV могут быть адаптированы для применения их в этих и других вирусных векторных системах для доставки генов *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предполагается использование нуклеиновых кислот и векторов, раскрытых в настоящем документе, в различных гAAV и не-гAAV векторных системах. Такие векторные системы могут включать, среди прочего, лентивирусы, ретровирусы, поксвирусы, вирусы коровьей оспы и аденовирусные векторные системы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предполагается, что вирусные частицы, нуклеиновые кислоты и векторы, раскрытые в настоящем документе,

полезны для различных целей, включая доставку терапевтических молекул для экспрессии генов терапевтических белков.

Терапевтические белки, кодируемые нуклеиновыми кислотами (включая, например, функционально связанные промоторы), описанные в настоящем документе, включают белки, используемые для лечения заболеваний сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ восстановления функции сетчатки у субъекта с CDSRR. Способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества вектора (такого как AAV вектор, лентивирусный вектор или ретровирусный вектор), который включает последовательности нуклеиновой кислоты гена KCVN2, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой субъекта с заболеванием сетчатки, таким как CDSRR.

В качестве варианта осуществления настоящего изобретения авторами изобретения реализована доставка нового гена KCVN2 серотипом AAV2/8, который, как было показано, обладает высокой трансдукционной способностью, которая в 100 раз выше, чем у некоторых других известных капсидов. Вектор на основе AAV2/8 оказался более эффективным вектором в отношении сетчатки по сравнению с векторами на основе AAV2/2 и AAV2/5; и это обеспечило как более быстрое начало, так и более сильную и высокую экспрессию трансгена, особенно в фоторецепторах.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы переноса генов для лечения CDSRR с использованием вектора на основе аденоассоциированного вируса серотипа 8 (AAV2/8), несущего оптимизированный по кодонам человеческий ген KCVN2 (ген 2 потенциал-зависимого калиевого канала подсемейства V (KCVN2)). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предлагаются способы переноса генов для лечения CDSRR с использованием вектора на основе аденоассоциированного вируса серотипа 8 (AAV2/8), несущего оптимизированный по кодонам человеческий ген KCVN2, экспрессия которого осуществляется под контролем промотора родопсинкиназы (RK). Этот вектор обозначен здесь как AAV2/8.RK.hKCVN2.

Доставка вектора, кодирующего трансген, может осуществляться, например, путем прямого введения его субъекту, например, путем субретинальной инъекции вектора. В конкретном примере доставка вектора может осуществляться, например, путем инъекции вектора в макулярную и/или фовеальную область в один или оба глаза пациента при наличии заболевания.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения доставка вектора, кодирующего трансген, может осуществляться, например, путем прямого введения субъекту, например, путем субретинальной инъекции вектора. В конкретном примере доставка вектора может осуществляться, например, путем инъекции вектора в макулярную и/или фовеальную область в один или оба глаза пациента при наличии заболевания. В этом варианте вектор AAV2/8.RK.hKCVN2 можно доставлять в нейтральном фосфатно-солевом буфере с плюронином F68 (0,001%), в объеме 0,10 мл, с диапазоном доз векторных геномов от $5E9$ до $5E11$.

Доставка в целом может осуществляться путем прямой доставки нуклеиновой кислоты в виде вектора, как описано в настоящем документе, путем инъекции в сетчатку, субретинальное или интравитреальное тело. Например, доставка может осуществляться путем инъекции в сетчатку, субретинальное пространство или интравитреальное пространство.

В настоящем изобретении также предлагается способ лечения или предотвращения дистрофий, в частности CDSRRR, у пациента, нуждающегося в этом, где способ предусматривает введение пациенту терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты с использованием вектора, как раскрыто в настоящем документе, путем прямого введения в сетчатку, субретинально или путем интравитреальной инъекции.

В родственном аспекте в настоящем изобретении предлагается применение нуклеиновой кислоты с использованием вектора, как раскрыто в настоящем документе, в способе лечения или предотвращения заболеваний сетчатки, таких как дистрофии, и, в частности CDSRR, путем введения указанного вектора пациенту путем прямого введения в сетчатку, субретинально или путем интравитреальной инъекции.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение нуклеиновой кислоты с использованием вектора, как раскрыто в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения нарушений сетчатки, таких как дистрофии, и, в частности CDSRR, путем прямой инъекции в сетчатку, субретинально или путем интравитреальной инъекции.

В настоящем изобретении также предлагается нуклеиновая кислота в составе вектора, как раскрыто в настоящем документе, для применения при лечении заболеваний сетчатки, таких как дистрофий, и, в частности CDSRR, где указанный вектор вводят непосредственно в сетчатку, субретинальное пространство или интравитреальное пространство.

Введение нуклеиновой кислоты с использованием вектора, как раскрыто в настоящем документе, обычно осуществляют путем прямой инъекции в сетчатку или

субретинально. Это включает прямую доставку к фоторецепторам колбочек и/или фоторецепторам палочек.

Композиции настоящего изобретения могут необязательно содержать другие фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие примеры консервантов включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и парахлорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

Рекомбинантные вирусные частицы, капсиды или векторы вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток и обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов для обеспечения терапевтического эффекта без нежелательных побочных эффектов или с приемлемыми с медицинской точки зрения физиологическими эффектами, которые могут определить специалисты в области медицины. Обычные и фармацевтически приемлемые способы введения включают, но без ограничения, прямую доставку в желаемый орган (например, глаз), пероральный, ингаляционный, интраназальный, внутритрахеальный, внутриартериальный, внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие парентеральные пути введения. При желании пути введения можно комбинировать.

Дозировки рекомбинантных вирусных частиц, капсидов или векторов будут зависеть, прежде всего, от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, возраст, масса тела и состояние здоровья пациента, и, таким образом, они могут различаться для разных пациентов. Например, терапевтически эффективная доза вирусного вектора для человека обычно находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 100 мл раствора, содержащего концентрации приблизительно от 1×10^9 до 1×10^{16} геномов вирусного вектора.

Рекомбинантные вирусные векторы по изобретению обеспечивают эффективный перенос генов, который обеспечивает доставку выбранного белка в выбранную клетку-хозяина *in vivo* или *ex vivo*, даже если организм имеет нейтрализующие антитела к этому белку. В одном варианте осуществления настоящего изобретения раскрытые здесь векторы и клетки смешивают *ex vivo*, затем инфицированные клетки культивируют с использованием обычных методик, и трансдуцированные клетки повторно вводят пациенту.

На Фиг.1 представлен вектор по изобретению. Вектор для доставки описанного здесь гена KCVN2 с оптимизированными кодонами с последовательностью SEQ ID NO: 2 может содержать один или несколько из следующих элементов:

Вектор серотипа AAV2/8

Промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6)

Оптимизированный по кодонам ген KCVN2 SEQ ID NO: 2

Регуляторные элементы, включая консенсусную последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) между промотором и геном KCNV2, посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP) (SEQ ID NO: 9) после гена KCNV2, и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)) (SEQ ID NO: 10) ниже WPRE. Раскрытый здесь вектор может иметь нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

На Фиг. 2 представлен второй вектор по изобретению. Вектор для доставки описанного здесь гена KCVN2 с оптимизированными кодонами с последовательностью SEQ ID NO: 2 может содержать один или несколько из следующих элементов:

AAV вектор

Промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6)

Оптимизированный по кодонам ген KCVN2 (SEQ ID NO: 2)

Зеленый флуоресцентный белок с усиленной флуоресценцией (EGFP)

Регуляторные элементы, включая консенсусную последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) между промотором и геном KCNV2 (SEQ ID NO: 2), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) (SEQ ID NO: 9) после гена KCNV2 (SEQ ID NO: 2) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)) (SEQ ID NO: 10) ниже WPRE (SEQ ID NO: 9).

На Фиг. 3 представлен третий вектор по изобретению. Вектор для доставки описанного здесь гена KCVN2 с оптимизированными кодонами с последовательностью SEQ ID NO: 2 может содержать один или несколько из следующих элементов:

AAV вектор

Промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6)

Оптимизированный по кодонам ген KCVN2 (SEQ ID NO: 2)

Зеленый флуоресцентный белок с усиленной флуоресценцией (EGFP)

Регуляторные элементы, включая консенсусную последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) между промотором и геном KCNV2 (SEQ ID NO: 2), промотор CMV (SEQ ID NO: 7), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) (SEQ ID NO: 9) после гена KCNV2 и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)) (SEQ ID NO: 10) ниже WPRE (SEQ ID NO: 9).

На Фиг. 4 представлен четвертый вектор по изобретению. Вектор для доставки описанного здесь гена KCVN2 с оптимизированными кодонами с последовательностью SEQ ID NO: 2 может содержать один или несколько из следующих элементов:

AAV вектор

Промотор родопсинкиназы (RK) (SEQ ID NO: 6)

Оптимизированный по кодонам ген KCNV2 (SEQ ID NO: 2)

Зеленый флуоресцентный белок с усиленной флуоресценцией (EGFP)

Регуляторные элементы, включая консенсусную последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) между промотором и геном KCNV2 (SEQ ID NO: 2), промотор CMV (SEQ ID NO: 7), промотор Iac, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) (SEQ ID NO: 9) после гена KCNV2 и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)) (SEQ ID NO: 10) ниже WPRE (SEQ ID NO: 9).

Выбор серотипа AAV

Для иллюстративного описания изобретения выбран серотип AAV2/8, в отношении которого было показано, что он обладает способностью к трансдукции, которая в 100 раз выше по сравнению с некоторыми другими известными капсидами. Также для иллюстративного описания изобретения выбран серотип Anc80. Серотип AAV2/8 в сетчатке оказался более эффективным вектором по сравнению с AAV2/2 и AAV2/5; и он обеспечил как более быстрое начало, так и более сильную и более высокую экспрессию трансгена, особенно в фоторецепторах. Вместо серотипа AAV2/8 также можно использовать серотип Anc80.

Промотор

Уровни экспрессии гена KCNV2, необходимые для восстановления функции сетчатки, неизвестны, но авторы настоящего изобретения полагают, что экспрессия KCNV2 может быть ограничена фоторецепторами как колбочек, так и палочек. Поскольку ген KCNV2 кодирует белок канала, то его повсеместная экспрессия в различных клетках сетчатки может иметь непредвиденные последствия. В составе терапевтической конструкции по изобретению использовали известный промотор родопсинкиназы (RK), поскольку он ограничивает экспрессию трансгена только в фоторецепторах.

Ген KCNV2

Для конструкции по изобретению в качестве трансгена был выбран человеческий ген KCNV2 (референсная последовательность NCBI: NM_133497.4; Ensembl gene ENSG00000168263.9 и транскрипт KCNV2-201 ENST00000382082.4) (SEQ ID NO: 1). Транскрипт KCNV2 имеет только один вариант сплайсинга и состоит из двух экзонов. Длина полного транскрипта составляет 2178 пар оснований, а длина кодирующей

последовательности (CDS), используемой в качестве основы для исследований и оценок, составляет 1638 пар оснований (SEQ ID NO: 12).

Перед разработкой конструкции была создана оптимизированная по кодонам версия CDS человеческого KCNV2 с использованием инструмента оптимизации кодонов от компании Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://sg.idtdna.com>). Обоснованием этого является связь кодонов с выработкой тРНК, улучшение стабильности транскриптов и защита от абберантного сплайсинга транскриптов. Используемый алгоритм IDT обеспечил наилучший вариант последовательности путем скрининга и фильтрации последовательностей для снижения сложности и минимизации вторичных структур.

Регуляторные элементы

Все трансгенные конструкции также содержали консенсусную последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) между промотором и геном KCNV2 (SEQ ID NO: 2), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) (SEQ ID NO: 9) после сигнала гена KCNV2 (SEQ ID NO: 2) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)) (SEQ ID NO: 10) ниже WPRE (SEQ ID NO: 9). Последовательность Козака (SEQ ID NO: 8) выполняет функцию инициатора трансляции белка в транскриптах эукариотической мРНК. WPRE (SEQ ID NO: 9) представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции создает третичную структуру, усиливающую экспрессию. Он используется для увеличения экспрессии генов, доставляемых вирусными векторами. Поли(A) BGH (SEQ ID NO: 10) представляет собой специализированную терминирующую последовательность для экспрессии белка в эукариотических клетках, которая приводит к образованию поли(A)-хвоста на 3'-конце мРНК. Кроме того, ДНК-вирусы млекопитающих, которые реплицируются в ядре, используют механизмы клеточного полиаденилирования. Поли(A)-хвост обеспечивает стабильность, транспорт и трансляцию большинства мРНК.

Получение векторов

Вектор по изобретению можно получить стандартными способами получения векторов для терапии, известными в данной области техники. Таким образом, для получения подходящего препарата, содержащего векторы, можно использовать общедоступные методы трансфекции, упаковки и очистки.

Конструкция разрабатывалась по следующим стадиям:

1. Разработка дизайна конструкции

Разработку терапевтической конструкции осуществляли с учетом того, какой промотор следует использовать для достижения желаемых уровней экспрессии, должен ли ген быть оптимизирован по кодонам или нет, какой полиА-сайт следует использовать и следует ли использовать какие-либо другие известные регуляторные последовательности.

2. Сборка конструкции

Фрагменты ДНК окончательной конструкции были синтезированы компанией Genewiz, и затем их клонировали в основную цепь плазмиды pAAV.

3. Упаковка в AAV

После того как конструкцию клонировали в основную цепь плазмиды pAAV, ее очищали и получали большее количество плазмид с использованием коммерческих наборов от Qiagen. Очищенную плазмиду упаковывали в AAV. Получение AAV осуществляли по стандартному протоколу. Получали партию AAV2/8 с использованием терапевтической плазмиды, и ее хранили на сухом льду.

Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых конкретных признаков и/или вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры не следует истолковывать как ограничивающие изобретения конкретными признаками или вариантами осуществления настоящего изобретения, описанными здесь ниже.

Пример 1

Исследования, подтверждающие правильность концепции в отношении выбранного терапевтического средства: генная терапия AAV8.RK.hKCNV2 снижает сверхнормальную амплитуду b-волн.

Для принятия решения о том, какой из трех потенциальных протестированных терапевтических продуктов будет выбран для дальнейших работ, были использованы результаты фундаментальных исследований, выполненных авторами изобретения. На основании результатов и данных по экспрессии генов, которые показали в среднем 8-кратное увеличение экспрессии генов по изобретению по сравнению с геном дикого типа, и данных о положительной b-волне ЭРГ, которые показали более высокую разницу и значительное снижение по сравнению с необработанными глазами при сравнении с другими продуктами, для дальнейших исследований, описанных ниже в этом примере, в качестве терапевтического продукта был выбран AAV вектор 8.RK.hKCNV2. Однако следует понимать, что также могут быть использованы и другие серотипы AAV, включая,

но без ограничения, серотип AAV Anc80. Ниже предоставлены результаты исследования и оценки указанного терапевтического продукта.

Протокол пилотных исследований на мышах (Фиг. 11)

1. Разведение и хранение вирусных частиц

Исходные растворы векторов хранили при -80°C . Рабочие образцы разводили в стерильном PBS до концентрации 1×10^{12} векторных геномов (vg)/мл, готовили аликвоты по 20 мкл в стерилизованных ПЦР-пробирках объемом 0,2 мл (пробирки с плоской крышкой для ПЦР SSIbo-UltraFlux, кат. № 3220-00) и хранили также при -80°C . В день инъекции разбавленную аликвоту(ы) оттаивали на льду (4°C) перед инъекцией. Для каждой серии инъекций ежедневно готовили новую аликвоту. Во время инъекций аликвоту хранили на льду. В этом исследовании исключали использование любой оставшейся суспензии из размороженной аликвоты векторов.

2. Субретинальная инъекция

Мышей P28-35 K8.2 KO обоих полов подвергали общей анестезии внутрибрюшинной инъекцией кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (20 мг/кг). Зрачки расширяли путем местного применения 1% тропикамида (мидриацил; Alcon).

Под хирургическим микроскопом делали небольшой разрез височной склеры глаза с помощью кончика иглы 30 калибра. Через разрез вводили скошенную или тупую иглу из нержавеющей стали калибра 35, прикрепленную к шприцу NanoFil, и в субретинальное пространство вводили вирусную суспензию/PBS с помощью ультрамикронасоса (World Precision Instrument) (SOP #1.06.08).

Каждому обработанному животному вводили субретинально 1 мкл вектора rAAV2/8-hGRK1-hKCNV2 (1×10^{12} GC/мл) (SEQ ID NO: 3) в один глаз (n=10, левый или правый случайно выбранный глаз). Другой глаз оставался неинъецированным. Контрольным животным субретинально инъецировали 1 мкл стерильного 1X фосфатно-буферного раствора (PBS) в один глаз (n=10, левый или правый случайно выбранный глаз), в то время как другой глаз оставался неинъецированным, и он служил внутренним контролем (n=20).

После этого с помощью оптической когерентной томографии (ОСТ) проводили контроль места инъекции и размера области инъецирования по наличию буллезного (пузырькового) отслоения сетчатки.

3. Электроретинография (ЭРГ)

Скотопическую ЭРГ проводили на мышах KCNV2 КО через определенные промежутки времени (4, 8 и 12 недель после инъекции), с целью определения, имеет ли место улучшение амплитуд а- и b-волн после лечения.

Перед проведением ЭРГ мышей адаптировали к темноте в течение ночи (не менее 8 часов), и затем работали с ними только при тусклом красном свете. ЭРГ выполняли, как описано ранее [6]. Мышам для наркоза ингаляционно вводили изофлюран, зрачки расширяли местным применением 1% раствора тропикамида (мидриацил; Alcon). На роговицу наносили искусственную смазку (на основе гидроксипропилметилцеллюлозы), чтобы избежать обезвоживания и облегчить контакт перед размещением электродов при ЭРГ на каждом глазу. Сравнительный подкожный игольчатый электрод вводили в каждую щеку или вдоль линии челюсти мыши, а заземляющий электрод вводили подкожно выше основания хвоста.

Электроретинограммы получали с использованием серии одиночных вспышек с адаптацией к темноте, при этом длительность вспышки составляла 1 мс при следующих интенсивностях (в $\text{кд/с}\cdot\text{м}^{-2}$): 0,1, 0,3, 1, 3, 10 и 25. Временной интервал между последовательными вспышками и количество повторений стимулирующего светового воздействия (для последующего усреднения) варьировали в зависимости от интенсивности стимула: 10 секунд и 4 повтора для 0,1-3 $\text{кд/с}\cdot\text{м}^{-2}$; и 60 секунд и 1 повтор для 10-25 $\text{кд/с}\cdot\text{м}^{-2}$. Перерыв между каждой серией световых вспышек составлял 60 секунд.

Фотопические электроретинограммы получали через 4 и 12 недель после инъекции после световой адаптации при фоновой яркости 30 $\text{кд/с}\cdot\text{м}^{-2}$. Электроретинограммы получали с использованием серии одиночных вспышек при длительности вспышек 1 мс при следующих интенсивностях (в $\text{кд/с}\cdot\text{м}^{-2}$): 0,3, 1, 3, 10 и 25. Каждый эксперимент со световым стимулированием с интервалом времени между вспышками 0,5 секунд повторяли 32 раз (для последующего усреднения). Перерыв между каждой серией световых вспышек составлял 60 секунд. Максимальные амплитуды и латентное время до появления пика для волн а и b определяли по электроретинограммам, как подробно описано в публикации Collison, F.T., J.C. Park, G.A. Fishman, E.M. Stone, and J.J. McAnany, Two-color pupillometry in KCNV2 retinopathy. *Doc Ophthalmol*, 2019, 139(1), p. 11-20. doi:10.1007/s10633-019-09691-w, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

4. Оптическая когерентная томография (ОКТ).

ОКТ-визуализацию проводили через 0-3 дня, через 2 недели и через 12 недель после инъекции с целью оценки того, улучшило ли лечение общую толщину слоев сетчатки по сравнению с необработанными или ложно обработанными глазами.

Мышей анестезировали и расширяли зрачки, как описано выше. ОКТ выполняли с помощью системы оптической когерентной томографии в спектральной области (Biortigen, система Envisu R2200 SD-OCT). Толщину слоя сетчатки анализировали с помощью программного обеспечения Biortigen и ImageJ.

5. Гистопатология

5.1 Получение срезов

Через 12 недель после инъекции у обработанных мышей и мышей, которым вводили PBS, извлекали глаза. Вкратце, глаза фиксировали в 4% PFA в течение 1 часа на льду. Роговицу и хрусталик иссекали, а затем глаза инкубировали в 20% сахарозе в течение ночи при 4°C. На следующий день глаза замораживали в смеси с оптимальной температурой для рассечения, и образцы хранили при -20°C перед изготовлением срезов. Образцы сетчатки помещали сверху на замороженные предметные стекла (Hurst) и разрезали с помощью Leica Cryostat CM3050 для получения срезов толщиной 14 мкм. Образцы рассекали в сагиттальной плоскости, и срезы собирали последовательно на 10 предметных стеклах. После получения срезов на предметных стеклах их хранили при -20°C до дальнейшего анализа.

5.2 Иммуногистохимия

Присутствие белка Kv8.2 в замороженных срезах сетчатки из групп животных получивших лечение, ложное лечение, без инъекции KCNV2-/-, и в сетчатке дикого типа животных соответствующего возраста оценивали *in situ* с использованием антитела Kv8.2 (Antibodies Inc, США, кат. № 75-435/73-435) в соответствии с опубликованными протоколами (Skarnes, W.C., B. Rosen, A.P. West, M. Koutourakis, W. Bushell, V. Iyer, A.O. Mujica, M. Thomas, J. Harrow, T. Cox, D. Jackson, J. Severin, P. Biggs, J. Fu, M. Nefedov, P.J. de Jong, A.F. Stewart, and A. Bradley, A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 2011, 474(7351), p. 337-42. doi:10.1038/nature10163). Также оценивали экспрессию *in situ* родопсина (Rho) (Abcam, кат. № Ab3424) и аррестина (Arr3) (Millipore, кат. № AB15282) в колбочках.

6.0 Оценка экспрессии генов с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR)

Суммарную РНК из сетчатки мышей, получавших лечение, и мышей, получавших ложное лечение, экстрагировали через 12 недель после инъекции с использованием реагента Тризол в соответствии с опубликованными протоколами. Затем образцы РНК транскрибировали в комплементарную ДНК (кДНК) с помощью обратной транскриптазы, используя набор для синтеза первой цепи кДНК ProtoScript® II (NEB, кат. № E6560S), либо набор для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen кат. № 205311), следуя протоколам,

рекомендованным производителем. Затем кДНК использовали в качестве матрицы для проведения qRT-PCR.

KCNV2, аррестин и родопсин в колбочках оценивали с использованием Taqman-анализа (Thermo Fisher) и аппаратуры для проведения ПЦР в реальном времени (Bio-Rad CFX Connect Real-Time System).

Статистический анализ данных

Толщину слоев сетчатки, определенную с помощью ОКТ-визуализации, максимальные амплитуды и латентное время для а- и b-волн, полученные с помощью ЭРГ, гистологию слоев сетчатки, и уровни экспрессии мРНК KCNV2, аррестина и родопсина колбочек, полученные с помощью qRT-PCR, для глаз животных, получавших лечение, животных, получавших PBS, и животных, не получавших лечения, сравнивали по значениям среднего и стандартного отклонения. Статистическую значимость оценивали с помощью стандартного t-критерия/однофакторного дисперсионного анализа.

Пример 2

На Фиг. 5 показана схема, иллюстрирующая способ восстановления функции сетчатки. Целевым состоянием, требующим лечения, является дистрофия колбочек со сверхнормальной реакцией палочек, например, вследствие мутации гена KCVN2. В одном примере терапевтическое вмешательство представляло собой введение AAV8.RK.hKCVN2 (SEQ ID NO: 3), который в данном случае является кодон-оптимизированным KCVN2, показанный в последовательности SEQ ID NO: 2. Типичный режим дозирования показан как 5×10^9 - 5×10^{11} vg в 0,10 мл, где дозу вводили в виде одной или нескольких субретинальных инъекций. Как обсуждается здесь, конструкция вектора специфически нацелена на экспрессию генов в фоторецепторных клетках и, более конкретно, на экспрессию в макулярной и/или фовеальной области сетчатки. Ожидаемым результатом являлось уменьшение положительной амплитуды пика b-волны, что коррелирует с улучшением зрительной функции.

Пример 3

На Фиг. 6 показана схема, иллюстрирующая исследование, подтверждающее правильность концепции. Стадия I предусматривает проведение фундаментальных исследований (FS) на животных дикого типа. Эти исследования предусматривают проведение первого тестирования способа доставки и подтверждение полезности субретинальных инъекций (обозначено как FS1). Введение жидкости в субретинальное пространство вызывает образование пузырька, временного и фокального разделения

фоторецепторов пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), поддерживающего их. Время пропадания пузырьков является показателем функции фоторецепторов. Результаты оценивали с помощью ОКТ в день инъекции, а также через 2 недели и через 12 недель после инъекции. Оптическая когерентная томография (ОКТ) представляет собой неинвазивный метод визуализации. Для ОКТ-визуализации используются волны светового диапазона, чтобы получить изображения поперечного сечения сетчатки. Это позволило визуализировать отдельные слои сетчатки, составить карту слоев и измерить толщину слоев.

После тестирования способа доставки подтверждено желаемое нацеливание промотора на фоторецепторы (обозначено как FS2). Сравнивали промоторы RK и CMV для определения способности каждого из них нацеливаться на мишени-фоторецепторы. В этом случае результаты оценивали с помощью гистологического анализа сетчатки через двенадцать (12) недель после инъекции.

Для определения влияния субретинальных инъекций на функцию сетчатки (обозначено как FS3) проводили оценку функциональной безопасности. Результаты оценивали по электроретинограмме (ЭРГ) через 4, 8 и 12 недель после инъекции.

Стадия II предусматривает проведение исследований на животных Kv8.2 КО по выбору терапевтического продукта. На этой стадии сравнивали три терапевтических продукта, каждый из которых имел разные серотипы AAV и разные промоторы. Тремя терапевтическими продуктами являлись, в частности, AAV8.RK.hKCVN2, Anc80.RK.hKCVN2 и AAV8.CMV.hKCVN2. Результаты в отношении безопасности инъекций оценивали на основании данных, полученных с помощью ОКТ, в день инъекции, через 2 недели и 12 недель после инъекции. Функциональную оценку проводили по результатам ЭРГ через 4, 8 и 12 недель после инъекции. Оценка экспрессии генов проводили с помощью анализа экспрессии гена KCVN2 в сетчатке через 12 недель после инъекции.

На Фиг. 7 представлена схема исследований на стадии III для исследования, подтверждающие общую концепцию настоящего изобретения. На стадии I показана оценка эффективности вектора, экспрессирующего оптимизированный ген KCVN2 (SEQ ID NO: 2). Протокол лечения описан в Примере 1, приведенном выше. Контрольные группы включают мышей, не получавших инъекцию, и мышей дикого типа, которым продукт инъекцировали субретинально. Их сравнивали с животными Kv8.2 КО, которым вводили AAV8.RK.hKCVN2 (например, SEQ ID NO: 3) в качестве средства лечения. Результаты оценивали на основании данных, полученных с помощью ОКТ (через 0, 3 и 12 недель после инъекции), ЭРГ (через 4, 8 и 12 недель после инъекции) и по экспрессии гена KCVN2 (через

12 недель после инъекции). На стадии II оценивали восстановление зрительной функции, чтобы определить эффект от лечения более высокими дозами. В этом случае лекарственный препарат AAV8.RK.hKCVN2 (например, SEQ ID NO: 3) вводили субретинально в двух режимах дозирования: 2×10^9 vg и 5×10^9 vg. Контролем являлись мыши без лечения. Результаты оценивали на основании данных, полученных с помощью ОКТ (через 0, 3 и 12 недель после инъекции), ЭРГ (через 4, 8 и 12 недель после инъекции) и по экспрессии гена KCVN2 (через 12 недель после инъекции). На стадии III оценивали безопасность и биораспределение. Оценку безопасности и биораспределения проводили после односторонних субретинальных инъекций AAV8.RK.hKCVN2 (например, SEQ ID NO: 3) у животных Kv8.2 КО. Субретинальные инъекции получали три группы животных: группа 1, которая получала только носитель (PBS); группа 2, которая получала лечение в дозе 1×10^9 vg/глаз; и группа 3, которая получала лечение в дозе 5×10^9 vg/глаз. Все животные были гомозиготны по Kv8.2 КО. Результаты оценивали с помощью офтальмологического обследования, ЭРГ, гематологии и клинической химии, гистопатологии тканей глаза и биораспределения векторных геномов (vg) в основных органах. Животных обследовали через 4 и 12 недель после инъекции.

В целом, результаты этих фундаментальных исследований использовали для принятия решения о том, какие три потенциальных терапевтических продукта будут использоваться в дальнейшем. На основании данных по экспрессии генов установлено, что ген KCVN2 с последовательностью SEQ ID NO: 2 показал в среднем 8-кратное увеличение экспрессии по сравнению с геном KCVN2 дикого типа. Результаты, полученные в отношении положительных b-волн ЭРГ, показали более высокую разницу и значительное снижение по сравнению с необработанными глазами, и по сравнению с другими протестированными продуктами. Поэтому AAV вектор 8.RK.hKCVN2 (SEQ ID NO: 3) был выбран в качестве продукта для терапевтического лечения.

Результаты

Функциональный анализ ЭРГ глаз животных получавших лечение, по сравнению с глазами животных дикого типа

На Фиг. 8, как отмечено выше, представлены результаты сравнения между мышами, получавшими лечение в соответствии со способом по изобретению, с использованием системы и нуклеотидной последовательности по изобретению, и мышами, не получавшими лечения. Для оценки эффективности лечения глаз с использованием SEQ ID NO: 2, а также с использованием вектора с последовательностью SEQ ID NO: 3, для восстановления функций фоторецепторов у субъекта (например, у субъекта с CDSRR), сравнивали положительную амплитуду b-волны ЭРГ между животными, получавшими лечение

(животные с CDSRR, представленные животными Kv8.2), животными, не получавшими лечение (животные с CDSRR, представленные животными Kv8.2), с этими же показателями, полученными для глаз животных дикого типа (животные дикого типа). Представлены результаты сравнения средней положительной амплитуды b-волны между мышами Kv8.2 KO, получавшими AAV8.Rk.hKCNV2 (Kv8.2 KO Tx), мышами не получавшими Kv8.2 KO (Kv8.2 KO UTx) и мышами дикого типа, не получавшими лечения, через 4, 8 и 12 недель после инъекции. Данные показаны при двух различных интенсивностях светового стимулирования (10 и 25 кд·с/м²). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, и статистическая значимость получена с помощью двустороннего дисперсионного анализа с поправкой Тьюки: *P<0,024; **P<0,003, ***P<0,0003 и P<0,0001. Как показано на Фиг. 8, одной субретинальной инъекции SEQ ID NO: 2 с SEQ ID NO: 3, оказалось достаточно для значительного уменьшения сверхнормального положительного пика b-волны по сравнению с необработанным глазом. Пик b-волны служит для оценки времени между световой вспышкой и пиком реакции или электрической активности сетчатки в ответ на световой раздражитель. Эти результаты подтверждают восстановление функции фоторецепторов с помощью SEQ ID NO: 2 с SEQ ID NO: 3, поскольку время ответа сетчатки уменьшается у животных Kv8.2 KO, получавших лечение, по сравнению с животными Kv8.2, не получавших лечения.

Экспрессия генов сетчатки после лечения

На Фиг. 9 представлены результаты по экспрессии маркерных генов колбочек (A: аррестин в колбочках) и палочек (B: родопсин) в сетчатке мышей дикого типа (WT) без лечения, по сравнению с сетчаткой после лечения *P<0,05; *P<0,01. Для дальнейшей оценки эффективности лечения с помощью SEQ ID NO: 2 с SEQ ID NO: 3 для восстановления функции фоторецепторов у субъекта (например, у субъекта с CDSRR) и поддержания палочек и колбочек в жизнеспособном состоянии, оценивали уровни экспрессии генов родопсина и аррестина в колбочках. Родопсин является маркером жизнеспособности палочек. Аррестин является маркером жизнеспособности колбочек. На Фиг. 9 показаны уровни экспрессии родопсина и аррестина в колбочках у животных дикого типа (WT), у животных, которым не вводили Kv8.2, и у животных, которым вводили Kv8.2. Эти данные показывают, что введение SEQ ID NO: 2 с SEQ ID NO: 3 приводило к экспрессии гена аррестина в колбочках. Оценка аррестина в колбочках показала статистически значимое увеличение уровня экспрессии генов после лечения по сравнению с необработанной сетчаткой. Хотя уровни родопсина выглядели сниженными по сравнению

с сетчаткой WT как в обработанной, так и в необработанной сетчатке, это различие не было статистически значимым.

На Фиг. 10 показаны результаты гистологического анализа с иммуногистохимическим мечением субъединиц Kv8.2 с помощью антитела против человеческого пептида KCVN2. Показана экспрессия белка Kv8.2 в обработанной области сетчатки, тогда как в необработанной области экспрессия белка Kv8.2 отсутствовала. В частности, на Фиг. 10 представлены репрезентативные микроснимки, на которых показана экспрессия субъединицы человеческого Kv8.2 в сетчатке мышей Kv8.2 KO, которым инъецировали SEQ ID NO: 2, доставляемую с помощью SEQ ID NO: 3, через 12 недель после лечения. (А): широкоугольный снимок срезов сетчатки, показывающий обработанную область (слева) и необработанную область (справа). Масштабная линейка соответствует 200 мкм. Вставка (I): снимок обработанной области при большем увеличении, где отчетливо видна экспрессия человеческого Kv8.2. Вставка (II): снимок необработанной области, где отсутствует экспрессия Kv8.2. Масштабная линейка для (I) и (II) соответствует 25 мкм.

Функциональный анализ ЭРГ обработанных глаз по сравнению с глазами мышей дикого типа

На Фиг. 12 и 13 представлены результаты сравнения между мышами, получавшими лечение в соответствии со способом по изобретению, с использованием системы и нуклеотидной последовательности по изобретению, и мышами, не получавшими лечения. Для оценки эффективности лечения с использованием SEQ ID NO: 2 с вектором SEQ ID NO: 3 для восстановления функции фоторецептора у субъекта (например, субъекта с CDSRR), сравнивали амплитуды а-волны и положительной b-волны на электроретинограммах (ЭРГ) глаз между обработанными животными (животные с CDSRR, представленные животными Kv8.2), необработанными животными (животные с CDSRR, представленные животными Kv8.2) и животными дикого типа (животные дикого типа (WT)). Количественную оценку проводили по скотопической (опосредованной палочкой) электроретинограмме (ЭРГ) для глаз животных дикого типа (WT), глаз животных Kv8.2 KO без обработки (без инъекции) и глаз животных Kv8.2 KO, обработанных субретинально терапевтическим продуктом AAV8.RK.hKCNV2 (SEQ ID NO: 3) в дозе, соответствующей 5×10^9 вирусных геномов (vg). Электроретинограммы снимали через 4 недели после лечения или после эквивалентного контрольного периода для мышей соответствующего возраста. Выборка: WT: n=12; без инъекции: n=11; AAV8.RK.hKCNV2: n=12. Использовали двусторонний дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Тьюки: *p

$<0,05$, $**p <0,005$, $***p <0,0005$, $****p <0,0001$. Полученные результаты показывают, что обработка последовательностью SEQ ID NO: 2, доставленной с помощью вектора с последовательностью SEQ ID NO: 3, восстанавливает функцию фоторецепторов у субъекта, такого как субъект с CDSRR, представленного животным Kv8.2 KO.

На Фиг. 14 показаны результаты количественной оценки скотопического осциляторного потенциала 1 (OP1) при $25 \text{ кд} \cdot \text{с}/\text{м}^2$ для глаз животных дикого типа (WT), глаз животных Kv8.2 KO без обработки (без инъекции) и глаз животных Kv8.2 KO, обработанных субретинально терапевтическим продуктом AAV8.RK.hKCNV2 в дозе, соответствующей 3×10^9 вирусных геномов (vg). Электроретинограммы снимали через 12 недель после лечения или после эквивалентного контрольного периода для мышей соответствующего возраста. Выборка: WT: $n=10$; без инъекции: $n=6$; AAV8.RK.hKCNV2: $n=6$. Использовали двусторонний дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Тьюки: $****p <0,0001$. Полученные результаты показывают, что обработка последовательностью SEQ ID NO: 2, доставленной с помощью вектора с последовательностью SEQ ID NO: 3, восстанавливает функцию фоторецепторов у субъекта, такого как субъект с CDSRR, представленного животным Kv8.2 KO.

На Фиг. 15 показаны результаты количественной оценки с-волны для глаз животных дикого типа (WT), глаз животных Kv8.2 KO не получавших лечение (без обработки) и глаз животных Kv8.2 KO, которым субретинально инъекцировали терапевтический продукт AAV8.RK.hKCNV2 в дозе, соответствующей 5×10^9 вирусных геномов (vg). Электроретинограммы снимали через 4 недели после лечения или после эквивалентного контрольного периода для мышей соответствующего возраста. Выборка: WT: $n=12$; без инъекции: $n=9$; AAV8.RK.hKCNV2: $n=15$. Использовали двусторонний дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Тьюки: $****p <0,0001$. Полученные результаты показывают, что обработка последовательностью SEQ ID NO: 2, доставленной с помощью вектора с последовательностью SEQ ID NO: 3, восстанавливает функцию фоторецепторов у субъекта, такого как субъект с CDSRR, представленного животным Kv8.2 KO.

Оптомоторная поведенческая реакция

На Фиг. 16 показаны результаты, подтверждающие улучшение фотопической и скотопической остроты зрения и скотопической контрастной чувствительности у мышей Kv8.2 KO через 12 недель после лечения. Животным Kv8.2 KO субретинально вводили AAV8.RK.hKCNV2 ($n=3-6$) в дозе, соответствующей 3×10^9 вирусных геномов (vg), и сравнивали с реакцией глаз животных Kv8.2 KO того же возраста, не получавших лечения

(без обработки, $n=3-5$), и животных дикого типа ($n=8$). Использовали двусторонний дисперсионный анализ с апостериорным множественным сравнением Сидака: $**p=0,0015$, $***p < 0,0001$. Различие между мышами WT и мышами, обработанными AAV8.RK.hKCNV2, было незначимым.

Результаты экспрессии генов и белков

На Фиг. 17, 18 и 19 представлены результаты гистологического анализа, подтверждающего экспрессию белка Kv8.2 и гена KCNV2 в глазу мышей Kv8.2 KO через 12 недель после лечения. На Фиг. 17 представлен микроснимок среза сетчатки глаза, подвергнутого субретинальной инъекции, где показана область, подвергнутая обработке, где экспрессируется субъединица Kv8.2 человека (зеленая флуоресценция), и область без обработки, где экспрессия Kv8.2 отсутствует. На Фиг. 18 представлены микроснимки обработанных и необработанных участков глаз с большим увеличением, показывающие экспрессию Kv8.2 (зеленая флуоресценция), экспрессию Kv2.1 (красная флуоресценция) и ядра клеток (синяя флуоресценция). Масштабная линейка соответствует 50 мкм. На Фиг. 19 представлены результаты количественной ПЦР в реальном времени, показывающие экспрессию человеческого гена KCNV2 в обработанных глазах, по сравнению с глазами животных дикого типа. $N = 3$ глаза.

На Фиг. 20 и 21 представлены результаты выравнивание последовательностей, со сравнением области, кодирующей человеческий KCVN2 (SEQ ID NO: 12), и последовательности оптимизированного гена KCVN2 (SEQ ID NO: 2), раскрытого в настоящем документе. В верхнем ряду представлена нуклеиновая кислота человеческого гена KCVN2 (SEQ ID NO: 12). В нижнем ряду представлена нуклеиновая кислота с последовательностью SEQ ID NO: 2. Сравнение последовательностей показывает, что SEQ ID NO: 2 приблизительно на 76% идентична последовательности SEQ ID NO: 12 человеческого гена KCVN2.

Специалисту ясно, что конкретные детали описанных способов или композиций могут быть изменены или модифицированы без отклонения от сущности описанных здесь вариантов осуществления настоящего изобретения. Авторы изобретения заявляют, что они имеют все права на такие модификации и вариации, и они входят в объем притязаний и патентной защиты, которые определяются приведенной ниже формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная нуклеотидная последовательность KCVN2, представленная в SEQ ID NO: 2, или последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, где указанная последовательность кодирует пептид SEQ ID NO: 11, и указанная последовательность способна восстанавливать активность фоторецепторов.

2. Вектор, содержащий модифицированную нуклеотидную последовательность KCVN2 по п. 1.

3. Вектор по п. 2, где вектор представляет собой вирусный вектор.

4. Вектор по п. 3, где вирусный вектор представляет собой AAV вектор.

5. Вектор по п. 2, где вектор представляет собой гамма-ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор.

6. Вектор по п. 4, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

7. Вектор по п. 4, дополнительно содержащий промотор RK, функционально связанный с SEQ ID NO: 2.

8. Вектор по п. 6, дополнительно содержащий по меньшей мере один из следующих элементов: консенсусная последовательность Козака, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH поли(A)).

9. Вектор по п. 7, в котором элементы расположены в следующем порядке от 5' до 3': промотор RK, за которым следует последовательность Козака, за которой следует последовательность SEQ ID NO: 2, за которой следует WPRE, за которым следует сигнал BGH поли(A).

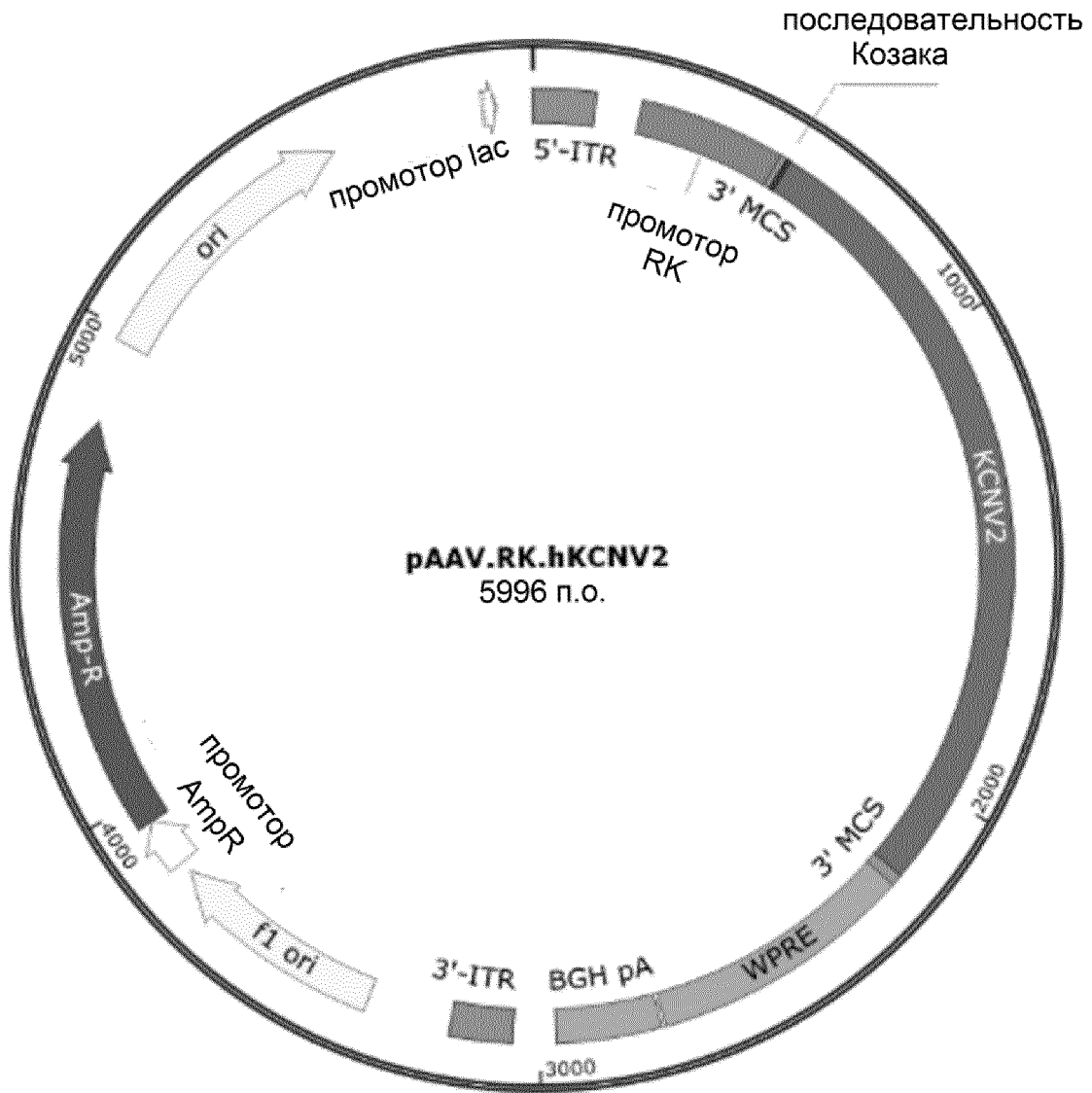
10. Нуклеотидная последовательность KCVN2, которая гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 2 и кодирует белок SEQ ID NO: 11, обладающий активностью в отношении фоторецепторов.

11. Нуклеотидная последовательность KCVN2 по п. 9, функционально связанная с промотором RK, последовательностью Козака, WPRE и сигналом BGH поли(A).

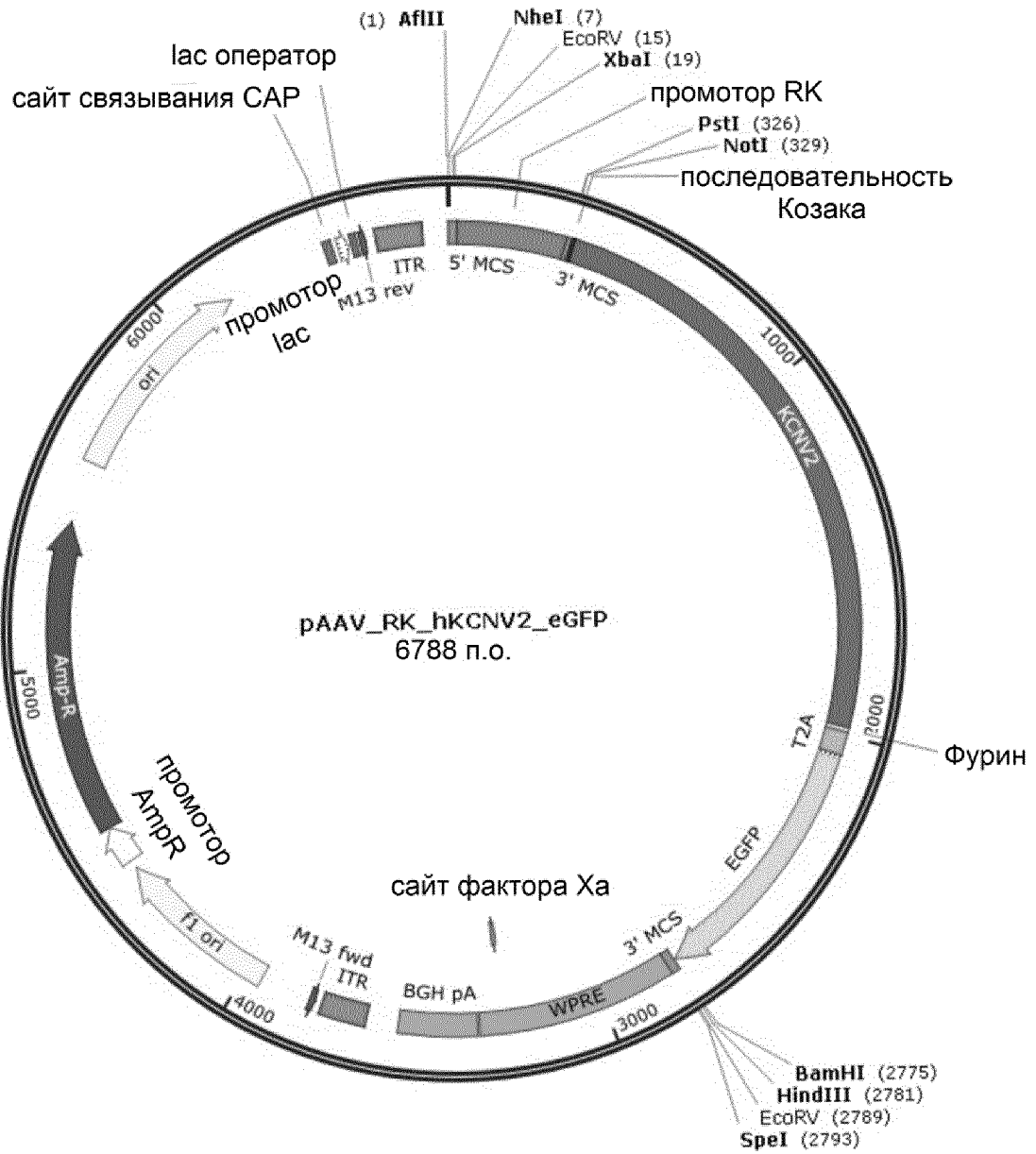
12. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по п. 2 в фармацевтически приемлемом носителе.

13. Фармацевтическая композиция по п. 11, составленная в форме для локального, системного или местного введения.

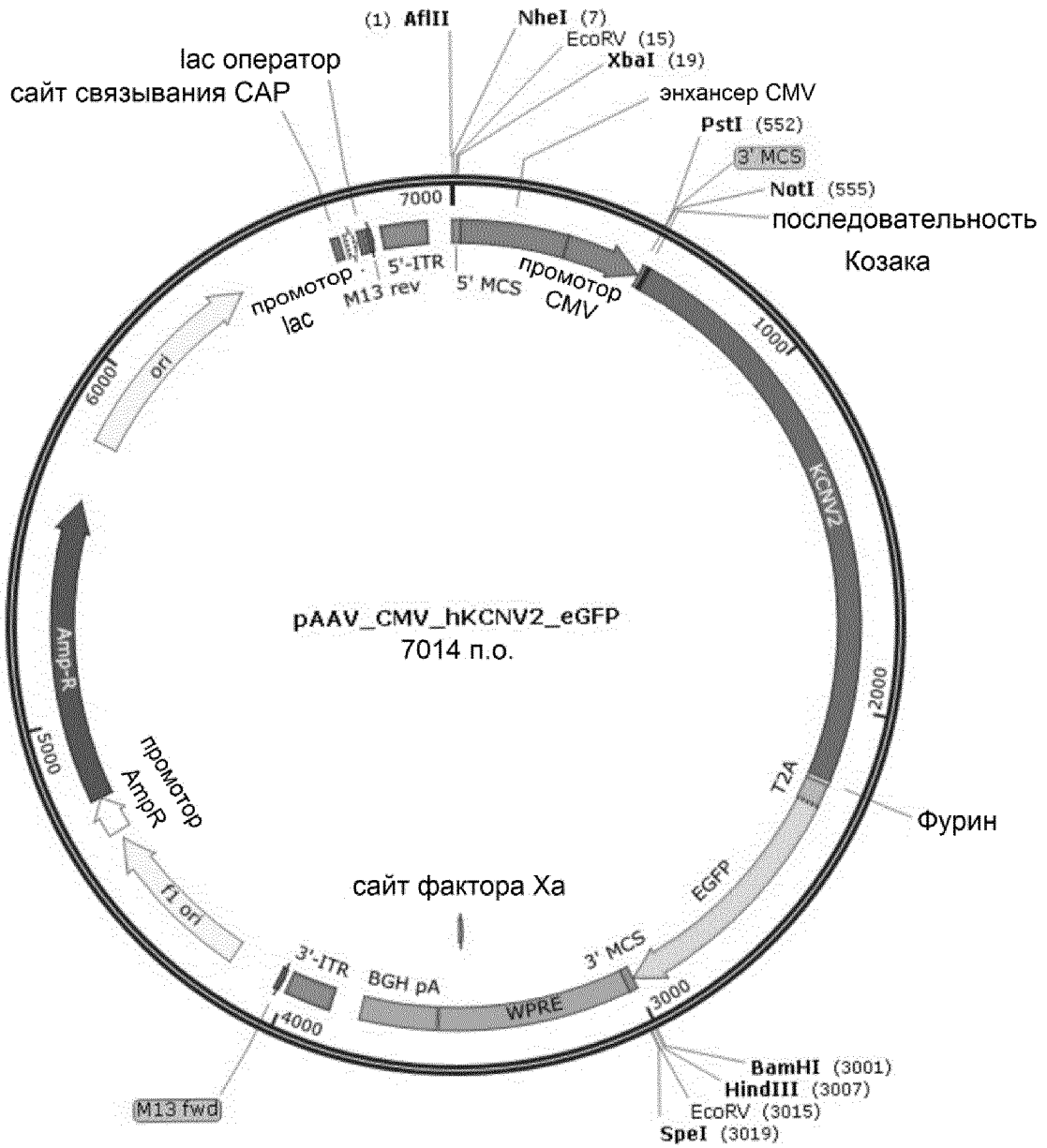
14. Фармацевтическая композиция по п. 12, составленная в форме для перорального, назального, легочного, буккального, чрескожного, подкожного, интрадуоденального, энтерального, парентерального, внутривенного или внутримышечного введения.



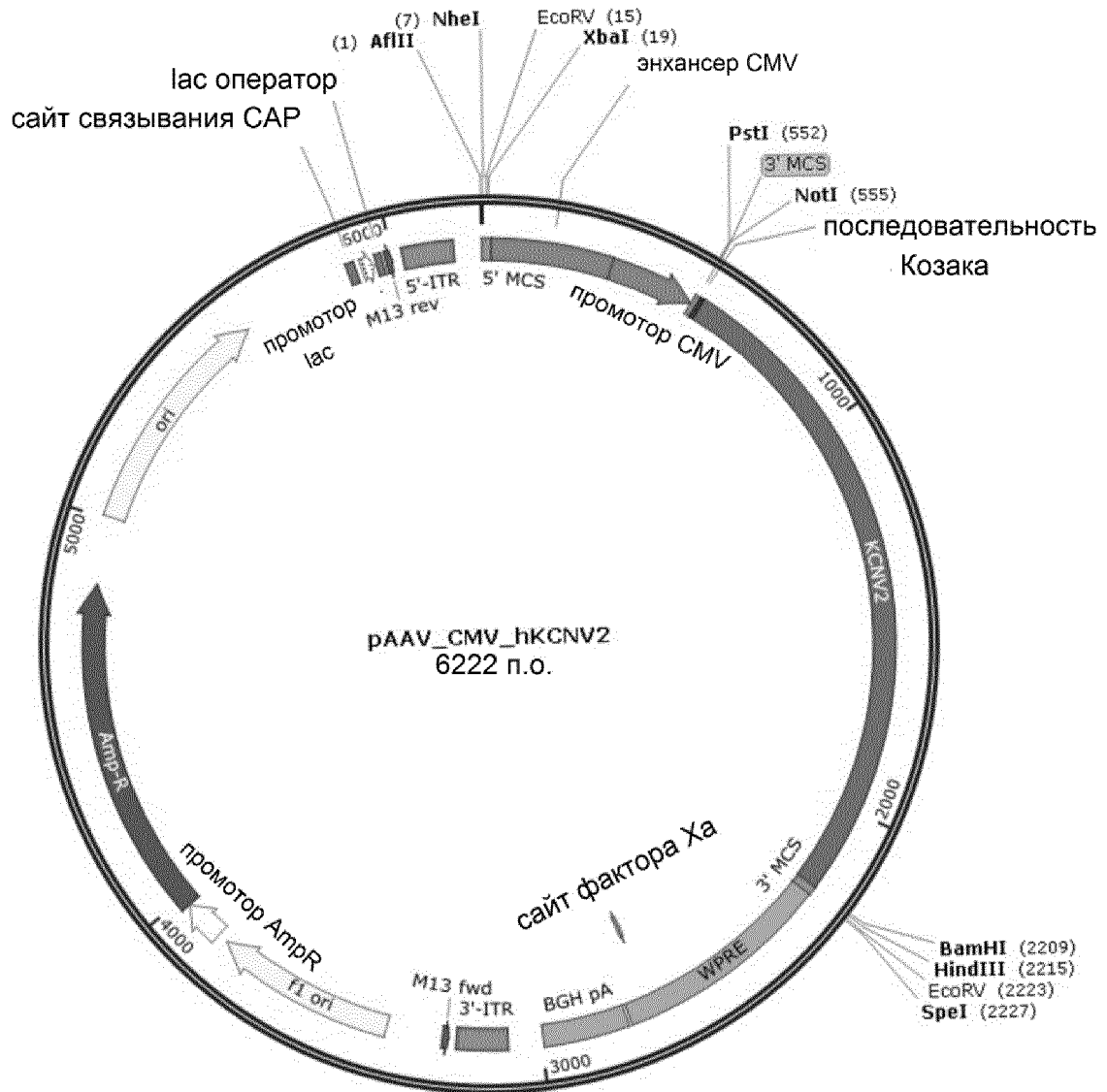
Фиг. 1



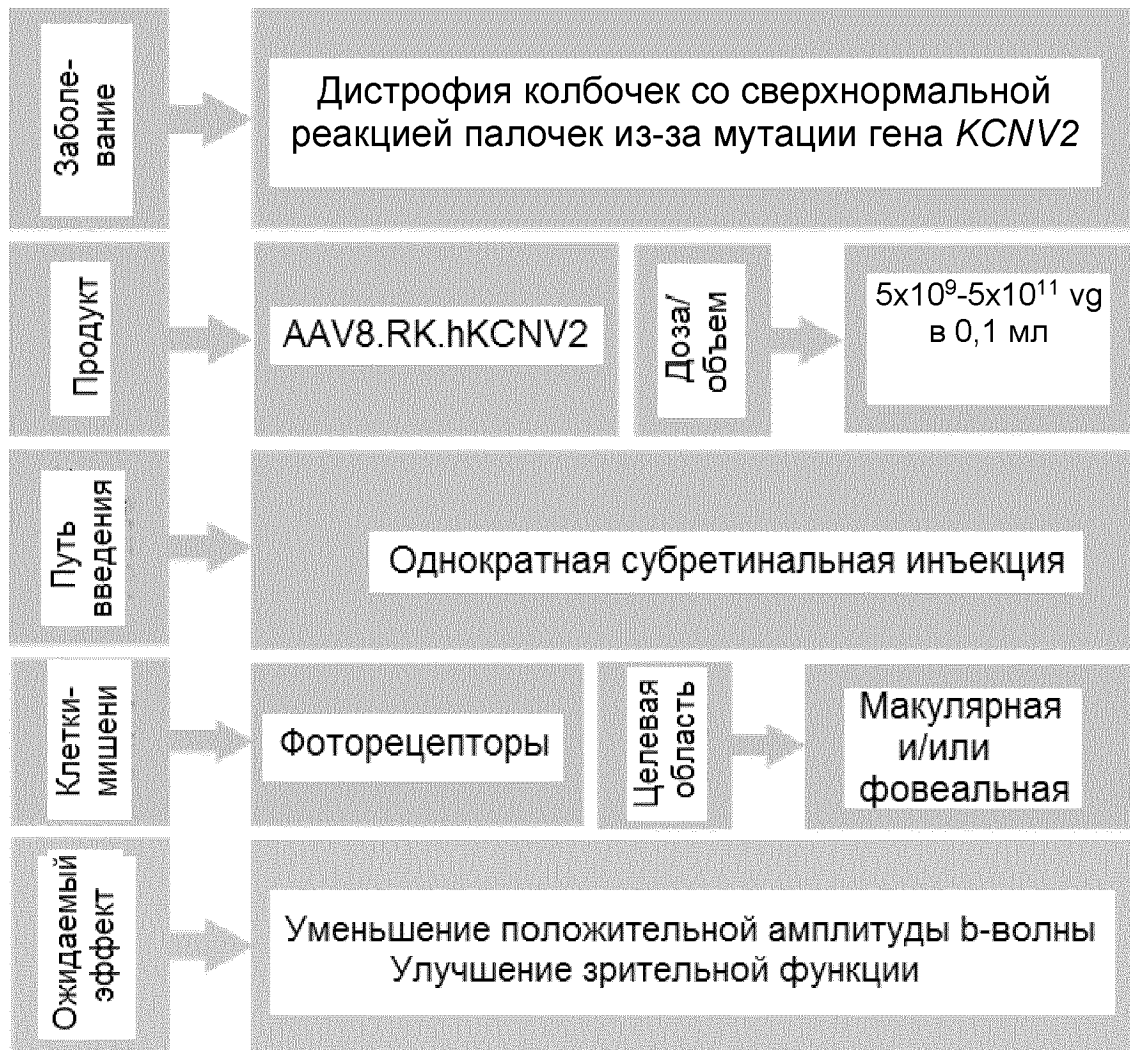
Фиг. 2



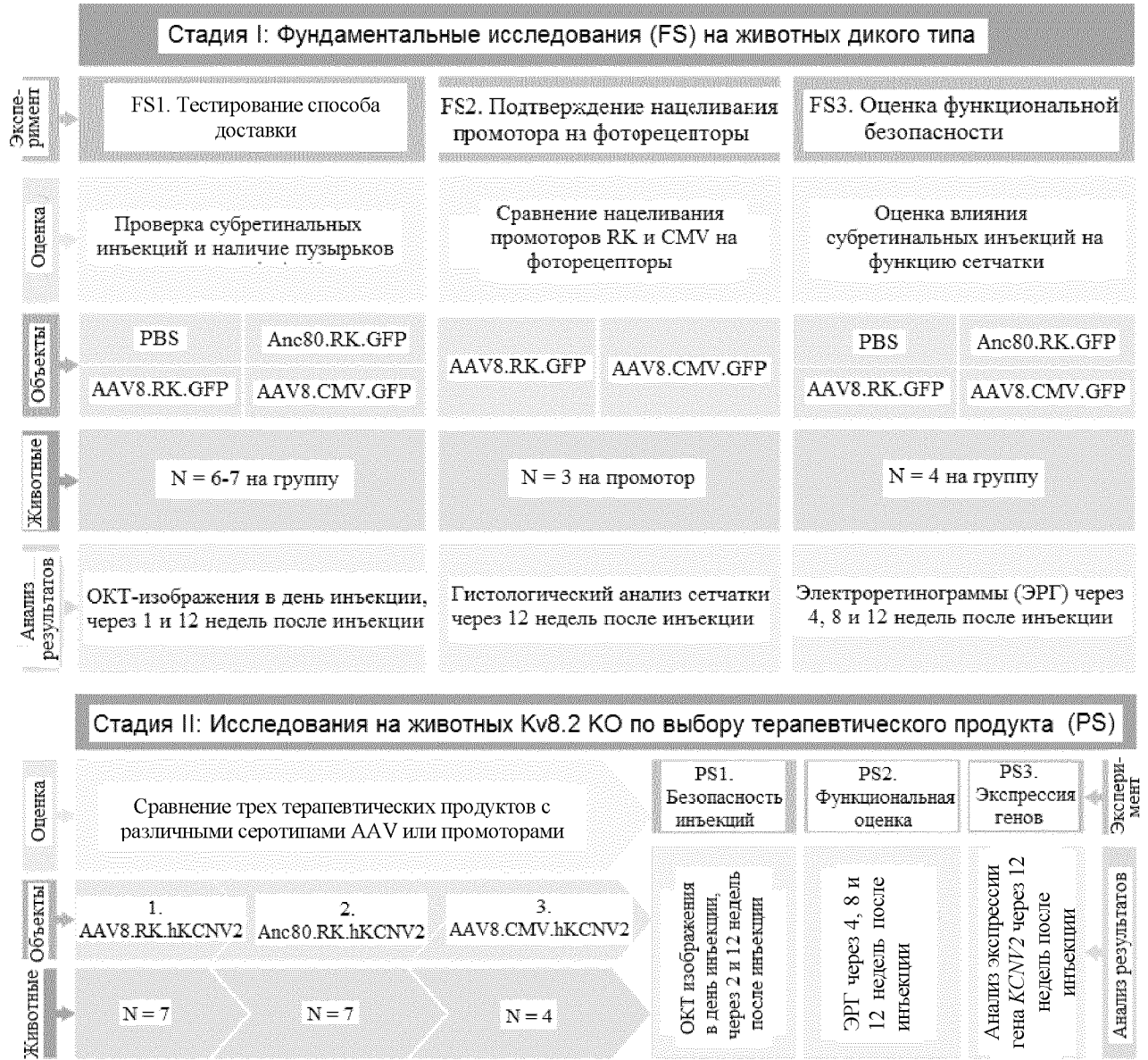
Фиг. 3



Фиг. 4



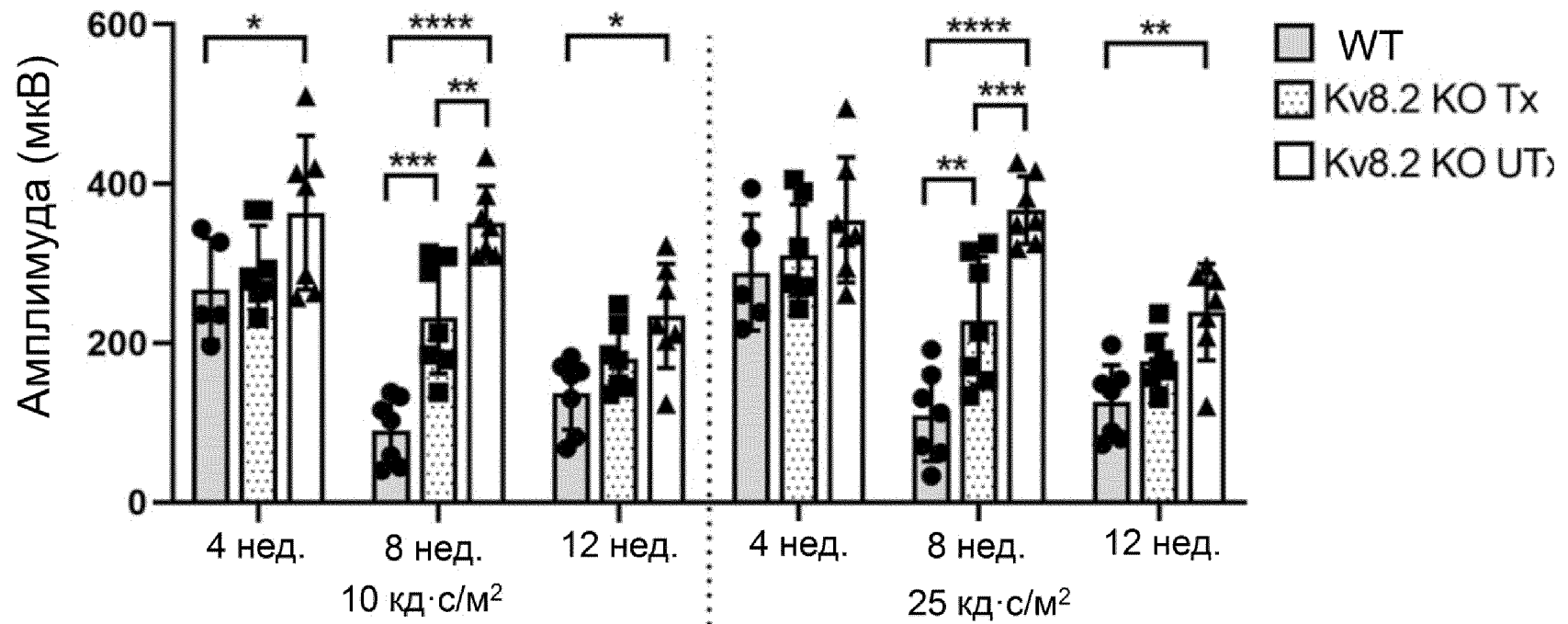
Фиг. 5



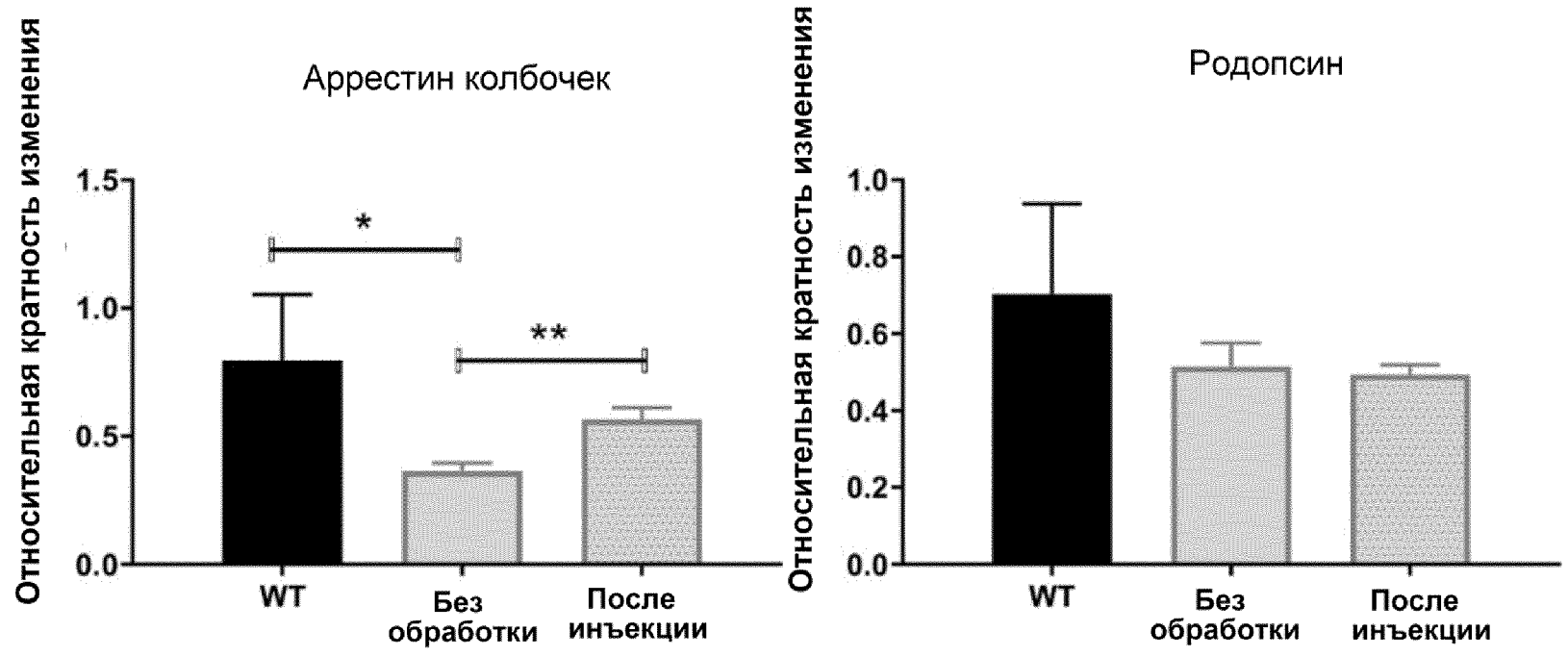
Фиг. 6

Стадия III: Исследования, подтверждающие правильность концепции (PC)						
Эксперимент	PC1. Оценка эффективности		PC2. Оценка дозы		PC3. Оценка безопасности	
Оценка	Определение эффективности продукта в отношении восстановления зрительной функции		Определение влияния более высоких доз на восстановление зрительной функции		Оценка безопасности и биораспределения односторонних субретинальных инъекций AAV8.RK.hCNV2 у мышей Kv8.2 KO	
Объекты	Лечение: введение AAV8.RK.hCNV2 Контроли: 1. Без введения 2. WT 3. Носитель (PBS)		Лечение: введение AAV8.RK.hCNV2 Дозы: 2x10 ⁹ vg 5x10 ⁹ vg Контроль: без введения		Группа 1: носитель (PBS) Группа 2: лечение* (низкая доза 1x10 ⁹ vg/глаз) Группа 3: лечение* (высокая доза 5x10 ⁹ vg/глаз) * лечение: введение AAV8.RK.hCNV2	
Животные	N = 10 (глаз) для групп лечения и контроля		N = 10 (глаз) на дозу		Группа 1: N = 30 (гомозиготные, Kv8.2 KO) Группа 2: N = 30 (гомозиготные, Kv8.2 KO) Группа 3: N = 30 (гомозиготные, Kv8.2 KO)	
Анализ результатов	ОКТ	ЭРГ	Экспрессия KCVN2	ОКТ	ЭРГ	Экспрессия KCVN2
	Офтальмологическое обследование ЭРГ Гематология и клиническая химия Гистопатология тканей глаза Биораспределение vg в основных органах					
Временные точки	0, 3, 12 недель после введения	4, 8, 12 недель после введения	12 недель после введения	0, 3, 12 недель после введения	4, 8, 12 недель после введения	12 недель после введения
Все исследования через 4 недели (15 животных) и 12 недель (15 животных) после введения						

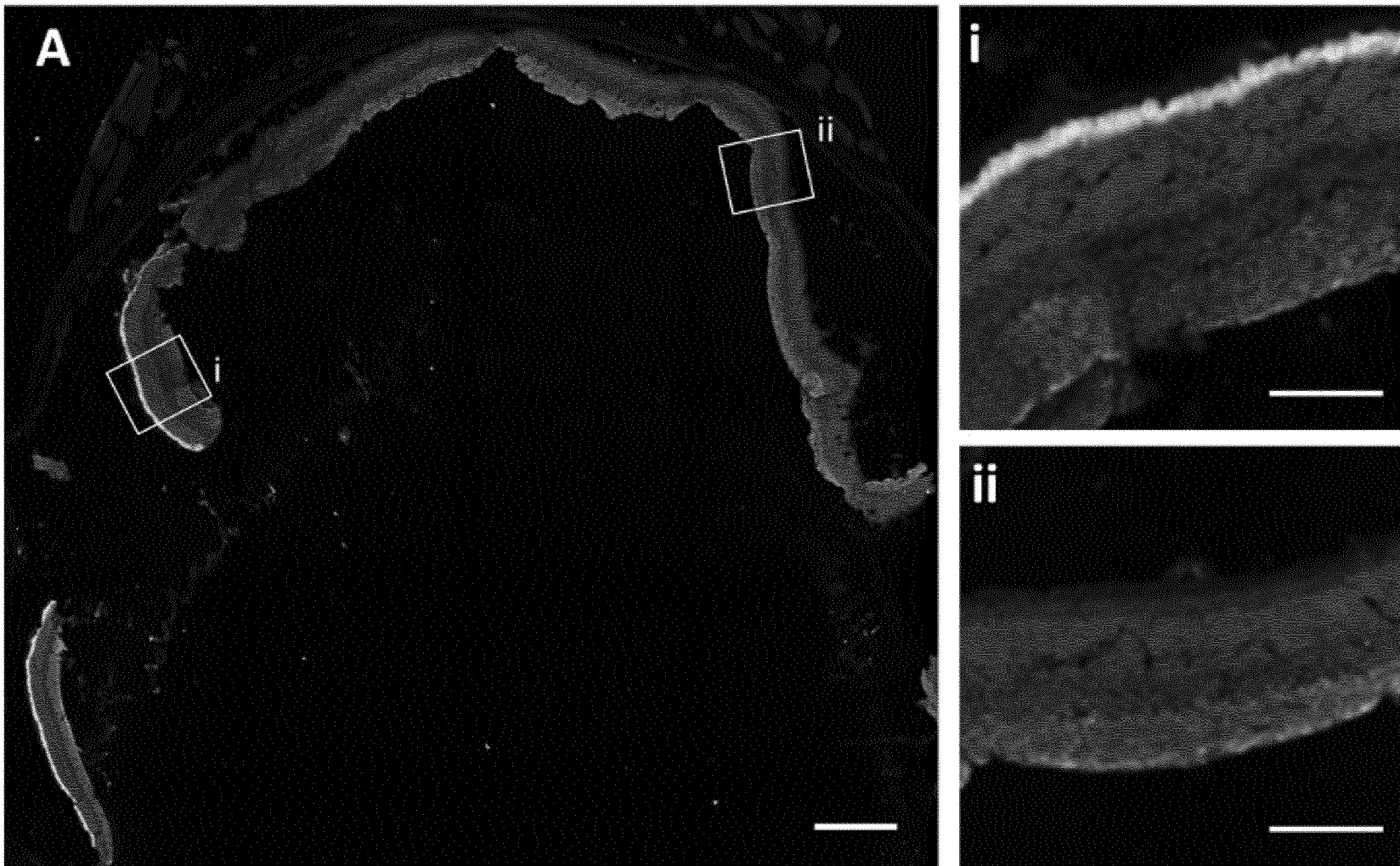
Фиг. 7



Фиг. 8



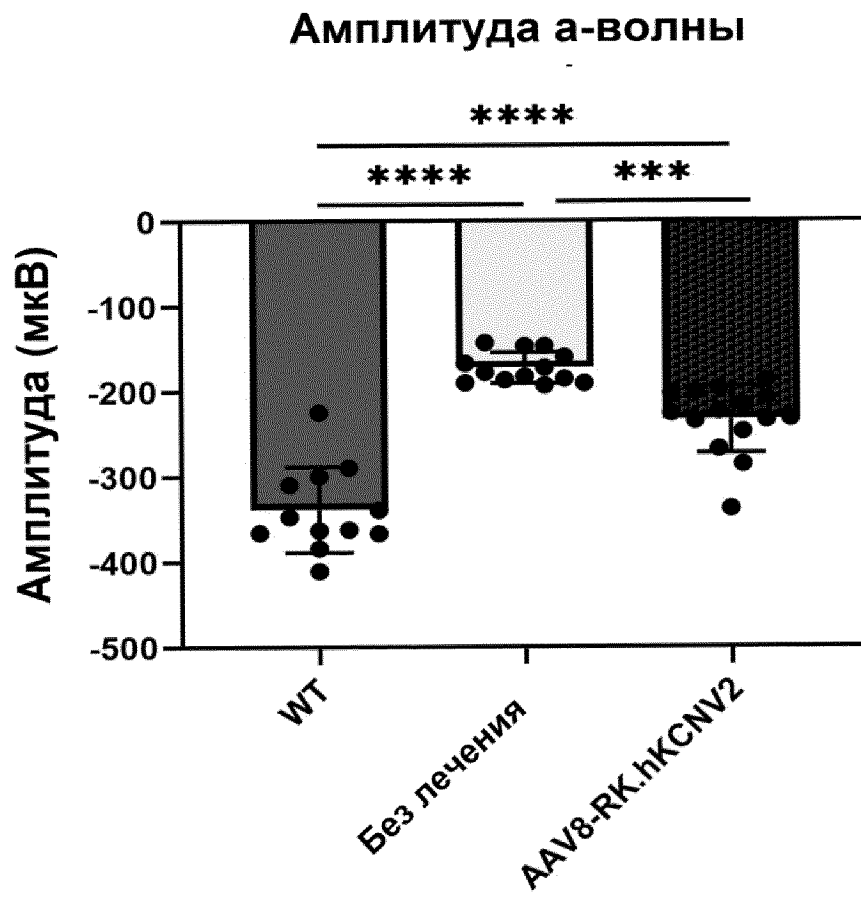
Фиг. 9



Фиг. 10

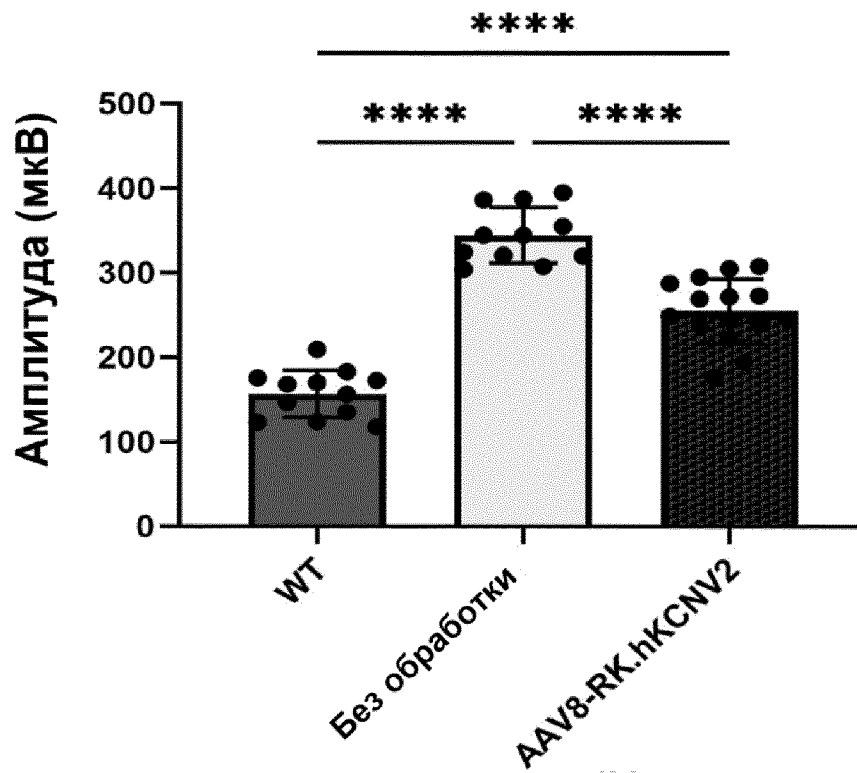
Группа	Кол-во глаз	Лечение	Животные, линия	Возраст	Доза, объем	ОКТ (время анализа)	Скотопическая ЭРГ (время анализа)	Фотопическая ЭРГ (время анализа)	Гистология (n=5)	qRT-PCR (n=5)
A	15	AAV2/8-RK-KCNV2	KCNV2 KO	28-35 дней	1 мкл (1x10 ¹² GC/мл)	<ul style="list-style-type: none"> • через 0–3 дня после инъекции • через 2 недели • через 12 недель 	<ul style="list-style-type: none"> • через 3–4 недели • через 7–8 недель • через 11–12 недель 	<ul style="list-style-type: none"> • 3-4 неделя • через 11-12 недель 	через 12 недель	через 12 недель
B	15	PBS	Как указано выше	Как указано выше	1 мкл	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше
C	15	Нет	Как указано выше	Как указано выше	Нет	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше	Как указано выше

Фиг. 11

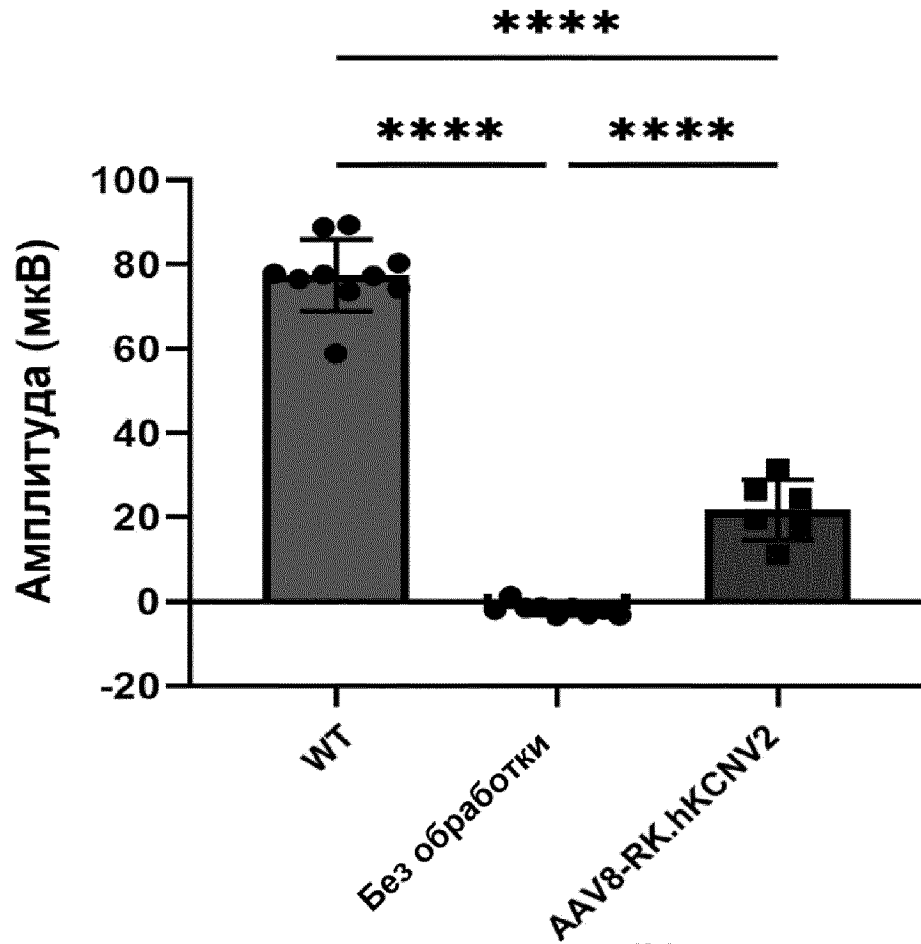


Фиг. 12

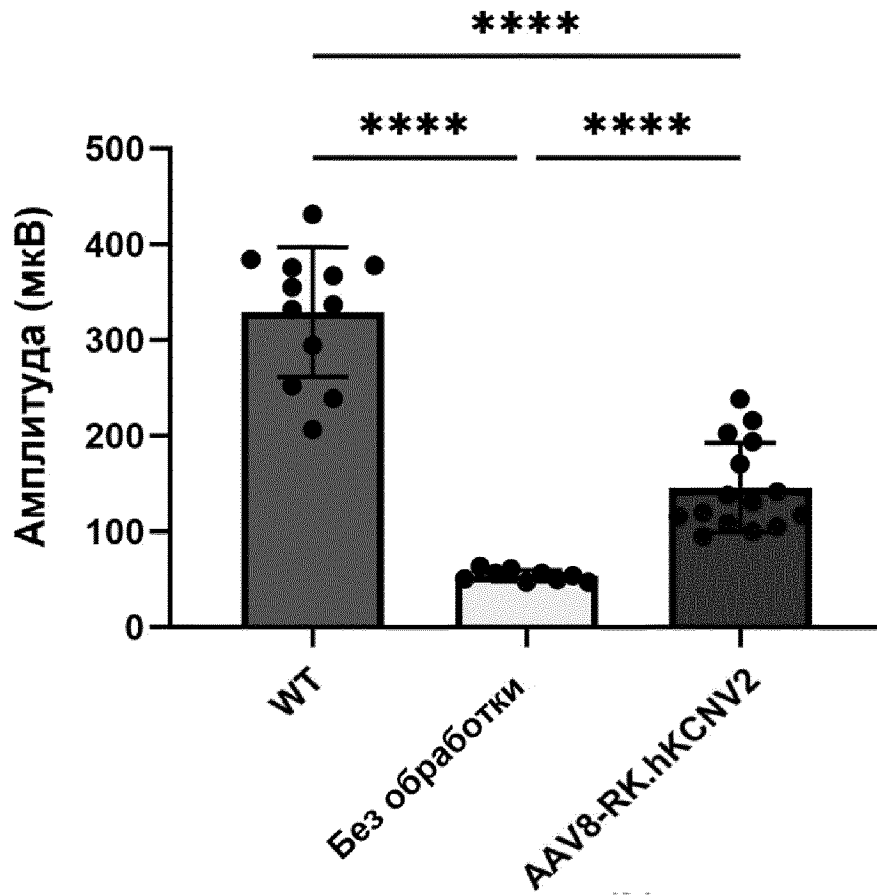
Амплитуда положительной b-волны



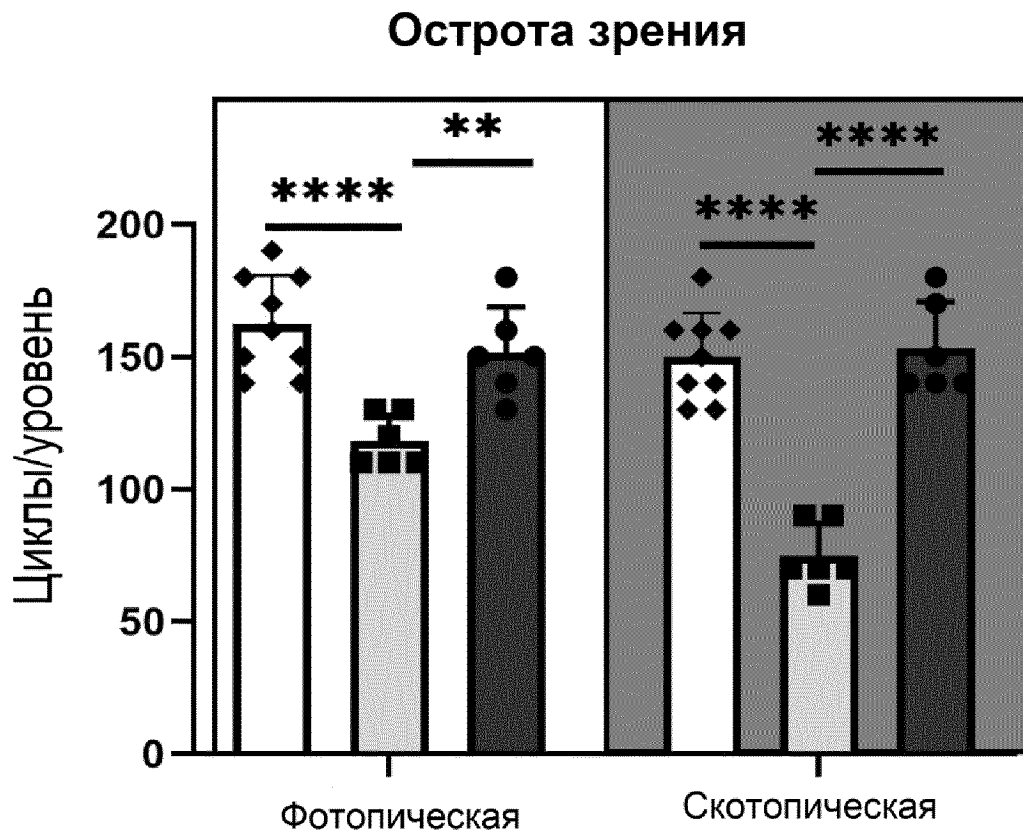
Фиг. 13



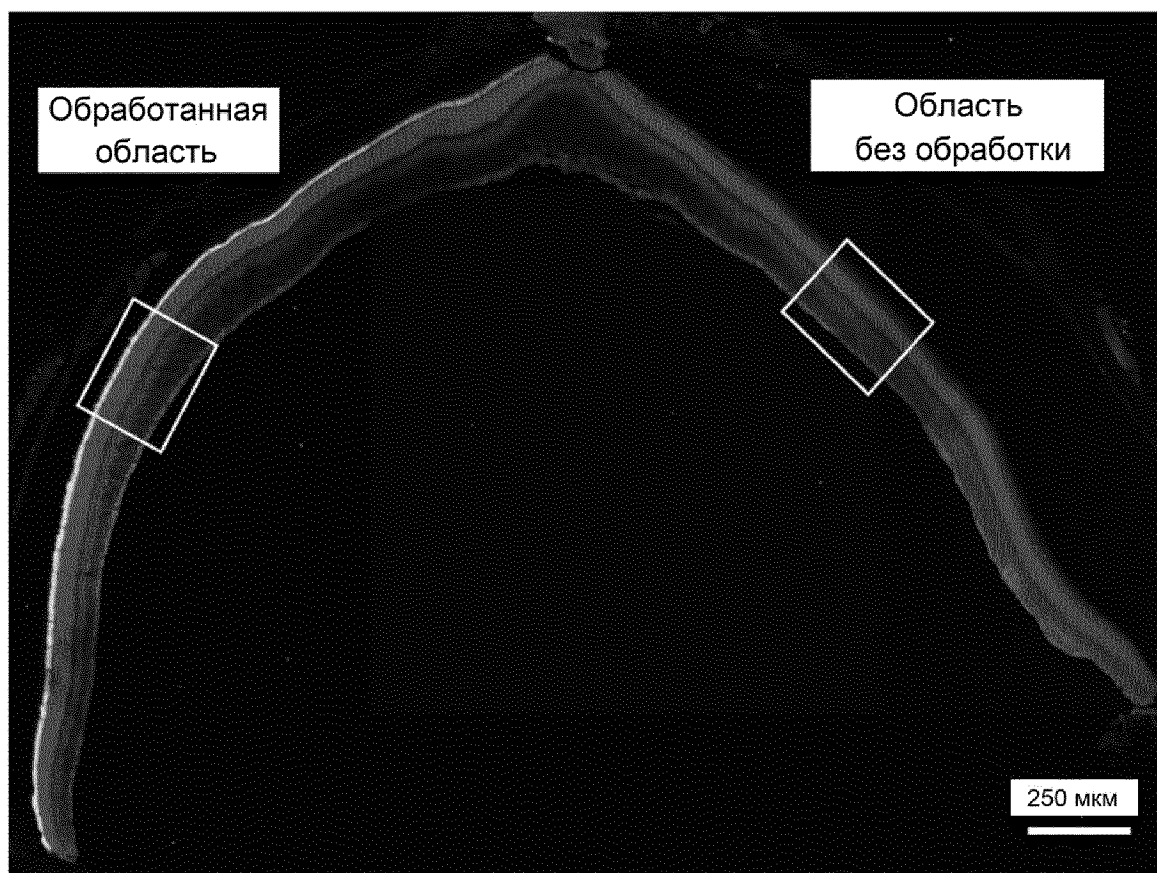
Фиг. 14



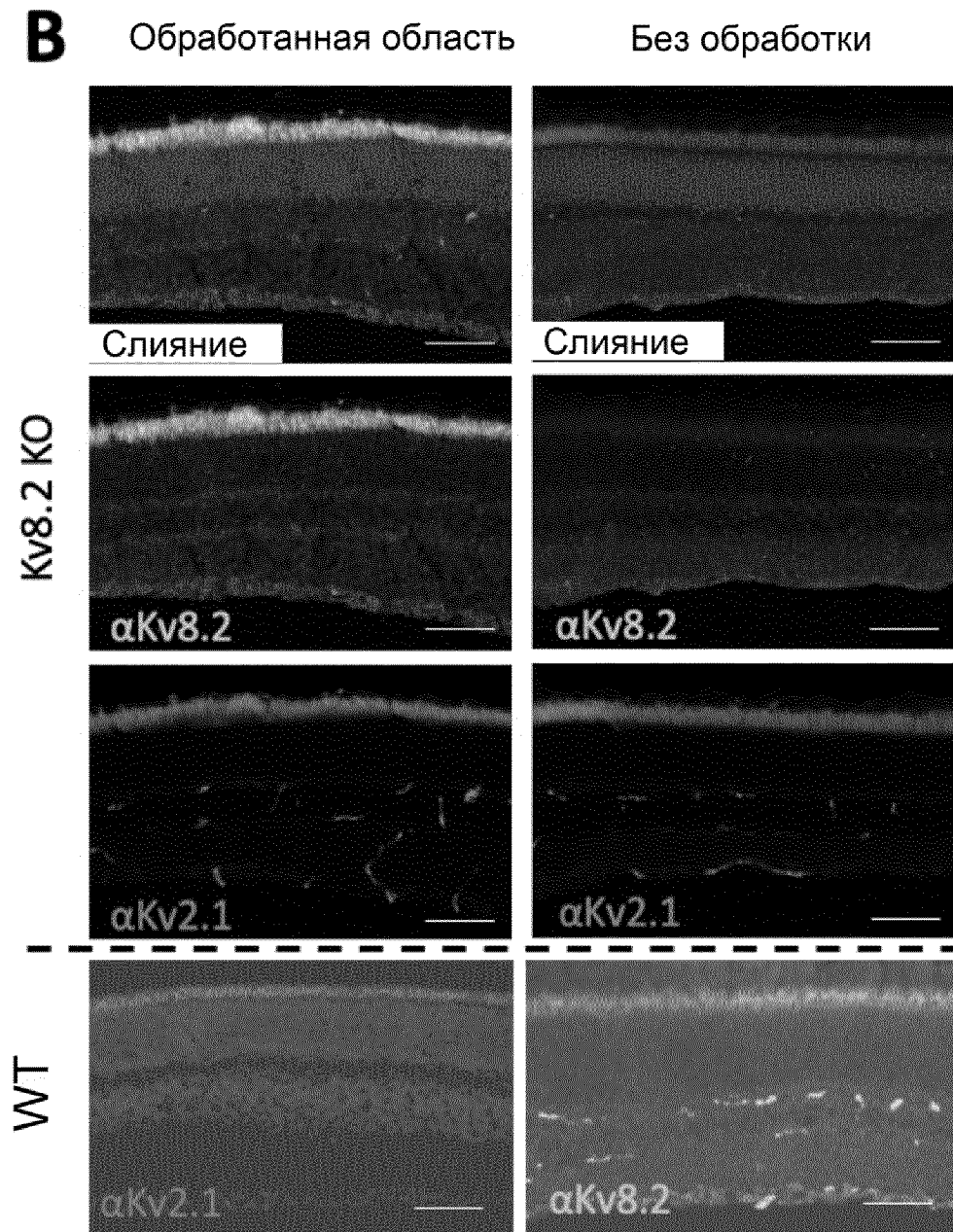
Фиг. 15



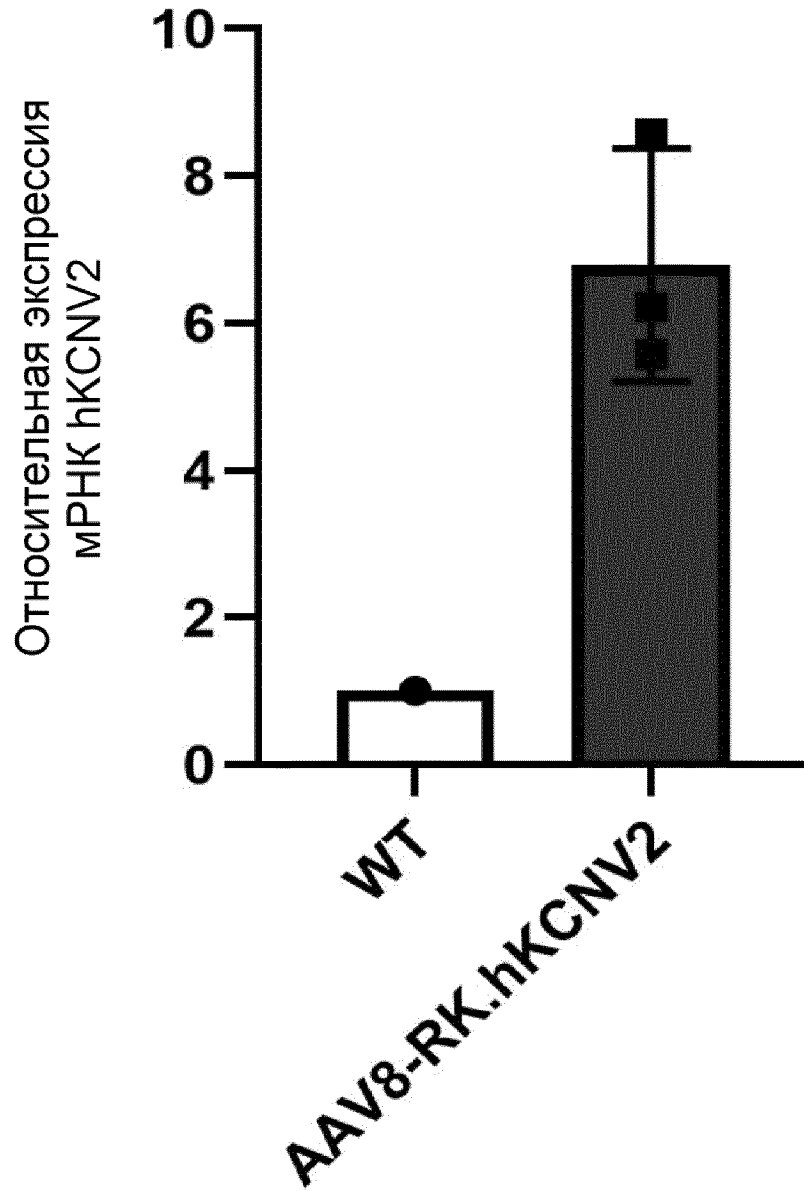
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

ATGCTCAAACAGAGTGAGAGGAGACGGTCCTGGAGCTACAGGCCCTGGAACACGACGGAGAA
ATGCTGAAGCAGAGTGAGAGGAGGAGGTCATGGAGTTATCGACCTTGGAACACGACTGAAAA

TGAGGGCAGCCAACACCGCAGGAGCATTGCTCCCTGGGTGCCCGTTCCGGCTCCCAGGCCA
CGAAGGCAGCCAGCATCGCAGATCCATTTGCTCCCTGGGGCGCGCAGTGGCTCACAAGCGT

GCATCCACGGCTGGACAGAGGGCAACTATAACTACTACATCGAGGAAGACGAAGACGGCGAG
CCATCCACGGCTGGACTGAAGGAAATATAACTACTATATAGAGGAGGACGAAGACGGAGAG

GAGGAGGACCAGTGGAAGGACGACCTGGCAGAAGAGGACCAGCAGGCAGGGGAGGTCACCAC
GAGGAAGACCAATGGAAAGATGATCTGGCGGAGGAAGATCAGCAAGCCGGTGAAGTGACCAC

CGCCAAGCCCCGAGGGCCCCAGCGACCCCTCCGGCCCTGCTGTCCACGCTGAATGTGAACGTGG
TGCTAAACCCGAAGGACCATCTGACCCACCTGCACTCTTGAGCACATTGAATGTAAATGTTG

GTGGCCACAGCTACCAGCTGGACTACTGCGAGCTGGCCGGCTTCCCCAAGACGCGCCTAGGT
GGGGTCACAGCTACCAATTGGATTACTGCGAGCTTGCCGGGTTTCCCAAGACTCGGCTCGGA

CGCCTGGCCACCTCCACCAGCCGCGAGCCGCCAGCTAAGCCTGTGCGACGACTACGAGGAGCA
AGGCTCGCAACATCCACAAGCAGGTCCCGGCAATTGTCACTGTGCGATGACTATGAAGAACA

GACAGACGAATACTTCTTCGACCGCGACCCGGCCGTCTTCCAGCTGGTCTACAATTTCTACC
AACAGACGAGTATTTCTTTGACAGGGACCCGGCTGTCTTCCAGTTGGTCTATAACTTCTATC

TGTCCGGGGTGCTGCTGGTGCTCGACGGGCTGTGTCCGCGCCGCTTCCCTGGAGGAGCTGGGC
TGTCAGGTGTTCTCCTCGTTCTCGATGGCCTGTGTCTCGGCGATTCTTGGAAGAACTCGGG

TACTGGGGCGTGCGGCTCAAGTACACGCCACGCTGCTGCCGCATCTGCTTTCAGAGGAGCGGCG
TACTGGGGGGTGAGGTTGAAATATAACCCTCGGTGCTGCCGCATTTGTTTTGAGGAAAGGCG

CGACGAGCTGAGCGAACGGCTCAAGATCCAGCACGAGCTGCGCGCGCAGGCGCAGGTTCGAGG
AGATGAGCTTTCAGAGCGGTTGAAGATACAACACGAACTTAGAGCGCAGGCTCAGGTAGAAG

AGGCGGAGGAACTCTTCCGCGACATGCGCTTCTACGGCCCCGAGCGGCGCCGCCTCTGGAAC
AAGCTGAAGAATTGTTTCGAGACATGAGATTTTATGGCCACAGCGCCGCCGGCTGTGGAAC

CTCATGGAGAAGCCATTCTCCTCGGTGGCCGCCAAGGCCATCGGGGTGGCCTCCAGCACCTT
CTCATGGAAAAGCCTTTCTCAAGTGTGCGCCGCCAAGGCTATTGGCGTTGCCAGCAGCACTTT

CGTGCTCGTCTCCGTGGTGGCGCTGGCGCTCAACACCGTGGAGGAGATGCAGCAGCACTCGG
CGTACTTGTGAGCGTAGTGGCACTGGCATTGAATACTGTAGAGGAGATGCAGCAGCACAGCG

Фиг. 20

GGCAGGGCGAGGGCGGCCAGACCTGCGGCCATCCTGGAGCACGTGGAGATGCTGTGCATG
GACAGGGTGAAGGGGGCCTGACCTTCGGCCTATCCTCGAACATGTCGAAATGCTCTGCATG

GGCTTCTTCACGCTCGAGTACCTGCTGCGCCTAGCCTCCACGCCCGACCTGAGGCGCTTCGC
GGTTTTTTCACCTTGAGTACCTTCTTCGACTTGCATCTACGCCAGACTTGCAGGATTTGC

GCGCAGCGCCCTCAACCTGGTGGACCTGGTGGCCATCCTGCCGCTCTACCTTCAGCTGCTGC
TAGGAGCGCTCTAACCTGGTTGACCTCGTCGCGATCCTGCCGTTGTACCTCCAGCTGCTTC

TCGAGTGCTTCACGGGCGAGGGCCACCAACGCGGCCAGACGGTGGGCAGCGTGGGTAAGGTG
TCGAGTGTTCACAGGTGAGGGTCACCAACGCGGCCAGACTGTGCGGAGCGTCGGAAGGTT

GGTCAGGTGTTGCGCGTCATGCGCCTCATGCGCATCTTCCGCATCCTCAAGCTGGCGCGCCA
GGTCAGGTTCGCGCGTCATGAGATTGATGAGGATATTTAGAATCCTCAAATTGGCTAGACA

CTCCACCGGACTGCGTGCCTTCGGCTTCACGCTGCGCCAGTGCTACCAGCAGGTGGGCTGCC
TAGTACTGGGTTGCGCGCATTCGGTTTTACCCTTCGACAGTGCTATCAGCAAGTTGGGTGCT

TGCTGCTCTTCATCGCCATGGGCATCTTCACTTTCTCTGCGGCTGTCTACTCTGTGGAGCAC
TGCTCTTGTTTCATCGCTATGGGAATCTTCACTTTTTCCGCCGCCGTATATTCGTAGAACAT



GATGTGCCCAGCACCAACTTCACTACCATCCCCACTCCTGGTGGTGGGCGCGGTGAGCAT
GACGTTCCCTCCACCAATTTACAACAATCCCGCATAGCTGGTGGTGGGCTGCTGTCTCCAT

CTCCACCGTGGGCTACGGAGACATGTACCCAGAGACCCACCTGGGCAGGTTTTTTGCCTTCC
CTCTACGGTCGGCTACGGCGACATGTACCCCGAAACGCACCTCGGTAGGTTCTTCGCATTTCC

TCTGCATTGCTTTTTGGGATCATTCTCAACGGGATGCCATTTCCATCCTCTACAACAAGTTT
TGTGCATCGCGTTTTGGAATCATTCTTAATGGTATGCCTATTTCAATACTTTACAATAAATTC

TCTGATTACTACAGCAAGCTGAAGGCTTATGAGTATAACCACCATACGCAGGGAGAGGGGAGA
TCCGATTACTACAGTAAATTGAAAGCATAACGAGTATACTACGATTCGGCGCGAGAGGGGCGA

GGTGA ACTTCATGCAGAGAGCCAGAAAGAAGATAGCTGAGTGTTTGCTTGGAAGCAACCCAC
AGTAAATTTTCATGCAGCGAGCAAGAAAAAATTGCCGAGTGTCTGCTGGGGAGTAATCCAC

AGCTCACCCCAAGACAAGAGAAT 
AGCTCACACCACGCCAAGAAAAC TAG

Фиг. 21